



***Facultad  
de  
Ciencias***

# **SENSORES ÓPTICOS DE pH** (Optical pH sensors)

Trabajo de Fin de Grado  
para acceder al

**GRADO EN FÍSICA**

**Autor: Javier Vicente Gómez**

**Director: Rafael Valiente Barroso**

**Octubre - 2019**

**Resumen:**

Se han analizado las propiedades ópticas de tres cromóforos, empleados en ensayos de biología celular y molecular, mediante el empleo de técnicas espectroscópicas. Estos cromóforos se caracterizaron para, posteriormente, evaluar su potencial uso como sensor óptico de pH.

Se obtuvo, como resultado final, el comportamiento general de cada colorante en función de la concentración y del pH. Para ello fue necesario obtener previamente las rectas de calibrado de la absorbancia frente a la concentración, del tiempo de vida medio frente a la concentración, así como de la emisión y la absorción frente a pH a diferentes concentraciones.

Partiendo de la base de que se pueden marcar distintas partes de la célula mediante colorantes con afinidad por los diferentes componentes celulares, se pretende verificar si estos cromóforos pueden servir como método para determinar el pH de los distintos componentes, a través de la microscopía de fluorescencia confocal. Se busca un sensor óptico, para medir el pH de una determinada disolución problema y además, sensible a las variaciones de éste, reversible y estable a los cambios químicos. Esto permitiría la determinación del pH con una gran resolución espacial de la que carecen los sensores empleados habitualmente en los laboratorio de química: pHmetros o papeles indicadores. Sin embargo, el objetivo último, la medida *in-situ* del pH en los distintos componentes de una célula eucariota, queda fuera del desarrollo de este TFG.

**Palabras Clave:** Sensor óptico, colorante, cromóforos, pH, Hoechst 33258, naranja de metilo, naranja de acridina, absorbancia, fluorescencia, tiempo de vida.

**Abstract:**

The optical properties of three different dyes, used in cell and molecular biology, have been analyzed through the use of spectroscopic techniques. The mentioned chromophores are characterized in order to subsequently evaluate their potential use as an optical pH sensor.

As a final result, the general behavior for each of the dyes, on the basis of concentration and pH, was obtained. In order to do so, it was necessary to previously obtain the following calibration curves: absorbance against concentration, average lifetime against concentration and emission and absorption spectra versus pH at different concentrations.

Based on the fact that different parts of the cell can be marked through dyes with affinity for different cellular components, it is sought to determine whether these chromophores can be employed for a new method of pH measurement, employing confocal fluorescence microscopy. We are looking for an optical sensor used to measure the pH of a specific test solution which is, additionally, sensitive to the pH variations, reversible and stable to the chemical variations. This technique would allow pH determination with a spatial resolution that the sensors, commonly used at any chemistry lab, is missing: pH meter or pH indicator papers. However, pH measurement of the different components of an eukaryotic cell are out of the goals of this project.

## Agradecimientos

Después de un intenso y apasionante período, escribo este apartado de agradecimiento, con el fin de tener un recuerdo de todas aquellas personas, que han estado presentes en mi vida, apoyándome y ayudándome durante este proceso.

Ha sido una etapa de aprendizaje intenso, no solo en el campo científico, también a nivel personal. Investigar y escribir sobre este trabajo ha tenido un gran impacto en mí y es por eso que me gustaría demostrar mi reconocimiento a todas aquellas personas que tanto me han ayudado y apoyado.

En primer lugar, estar eternamente agradecido a mis padres y a mi hermana, por sus sabios consejos y su comprensión infinita. Siempre habéis estado presentes, con un amor y confianza incondicional.

De la misma forma a Sara, al permanecer a mi lado, apoyándome tanto en los buenos y no tan buenos momentos, mostrándome todo su cariño.

En segundo lugar, me gustaría darle las gracias de una manera especial a Rafa, mi director de trabajo de fin de grado, por su valiosa profesionalidad aportando toda su experiencia, paciencia y sentido del humor. También me gustaría acordarme de Carlos, por el apoyo prestado y entusiasmo en todo lo “bio”. De igual manera, de las chicas del Grupo de Nanomedicina, en la Facultad de Medicina, que me sacaron de más de un aprieto, y de Andrea, que hizo lo propio en los laboratorios de la Facultad de Ciencias. Definitivamente me habéis brindado todas las herramientas necesarias para completar mi trabajo de fin de grado satisfactoriamente.

Y, por último, a mis amigos. En especial a Gerardo, por sus productivos consejos. No solo habéis estado ahí para apoyarme en los momentos difíciles, sino que además hemos crecido juntos como personas.

GRACIAS.

## Índice

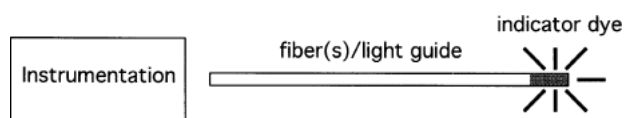
1. Introducción.....	1
1.1. Estado del arte .....	10
1.1.1. Método ponteciométrico: pH-metro .....	10
1.1.2. Indicadores de pH o indicadores acido-base .....	10
2. Procedimiento experimental: Materiales y métodos.....	13
2.1. Materiales .....	13
2.1.1. Hoechst 33258.....	14
2.1.2. Naranja de Acridina .....	16
2.1.3. Naranja de Metilo .....	18
2.2. Métodos.....	20
2.2.1. Técnicas espectroscópicas.....	20
2.2.2. pHmetro Sension+ PH3. ....	26
3. Resultados y discusión.....	27
3.1. Hoechst 33258.....	27
3.1.1. Absorción Óptica .....	27
3.1.2. Espectros de Luminiscencia y Excitación.....	28
3.1.3. Tiempos de Vida.....	30
3.1.4. Influencia del pH en el Hoechst 33258.....	32
3.2. Naranja de Acridina .....	32
3.2.1. Absorción Óptica .....	32
3.2.2. Espectros de Luminiscencia y Excitación.....	36
3.3. Naranja de Metilo .....	36
3.3.1. Absorción Óptica .....	36
3.3.2. Espectros de Luminiscencia .....	42
3.3.3. Tiempos de Vida.....	45
4. Conclusiones.....	47
5. Referencias .....	49

## 1. Introducción

Al introducirnos en el mundo de la física, se nos enseña que los átomos, moléculas y sólidos emiten radiación electromagnética cuando son sometidos a un estímulo (luz: fotoluminiscencia, reacción química: quimioluminiscencia, presión: piezoluminiscencia, campo eléctrico: electroluminiscencia,...); que tienen su origen en transiciones electrónicas entre estados energéticos de alta energía a estados energéticos de menor energía, por ejemplo, el estado fundamental. La espectroscopía ha jugado una parte importante en el desarrollo de la bioquímica. Se ha utilizado para medir velocidades de reacción catalizadas por enzimas, para medir concentraciones de compuestos, determinar conformaciones estructurales e interacciones moleculares. Es en este trabajo justamente, donde vamos a unir el concepto de espectroscopía óptica al de sensor en un medio biológico mediante la medida del pH.

Los sensores reaccionan ante cambios mínimos, tanto físicos (temperatura, presión, aceleración, vibración, campo electromagnético, radiación, deformación...) como químicos (niveles de gas, oxígeno, acidez y humedad, entre otras). Los **sensores ópticos** son pequeños sistemas capaces de reconocer de forma continua concentraciones de constituyentes químicos en líquidos o gases y convertir esta información en una señal óptica o eléctrica (*Gras, Maestre, Mora, & Todolí, 2005*). Dichos sensores se basan en “indicadores ópticos” que cambian sus propiedades en función del analito (Fig. 1). En química analítica, analito es una especie química cuya presencia o contenido se desea conocer, identificable y cuantificable, mediante un proceso de medición química.

En el caso del pH, dependiendo de la propiedad óptica que cambia, los sensores pueden clasificarse en sensores de absorbancia o de luminiscencia. En los sensores de absorbancia la relación entre intensidad de la luz incidente y la luz transmitida están en relación directa con el valor del pH de la muestra, o bien se pueden producir cambios en la forma o posición de la banda de absorción. En los sensores de luminiscencia la dependencia con el pH viene dada por el cambio en la longitud de onda de la luz emitida o por un cambio en su intensidad y posiblemente en el tiempo de vida del estado emisor.



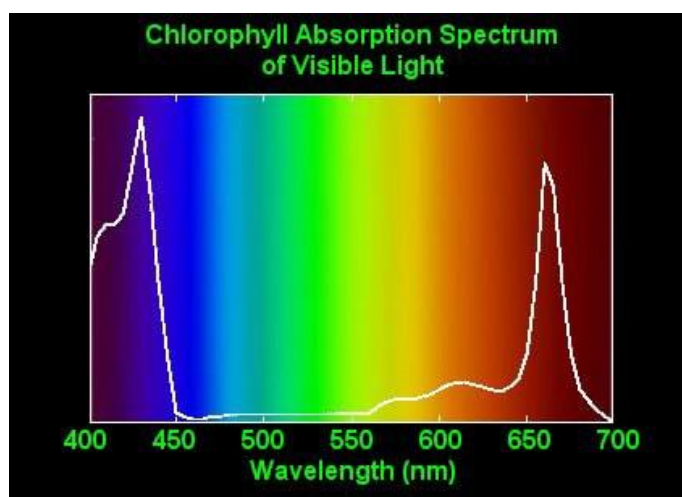
**Figura 1.** Esquema de un sensor óptico (*Dybko, A., 2006*)

Las ventajas que proporcionan los sensores ópticos son las de realizar medidas con una gran resolución espacial, y la de poder obtener dichas medidas a través de la luz, sin contacto directo con la muestra. Como ventajas generales de los sensores ópticos se pueden mencionar la facilidad de su miniaturización, permite el desarrollo de sensores muy pequeños, ligeros y flexibles. Además, debido a que la señal primaria es óptica, no está sujeta a posibles interferencias eléctricas. En el apartado de posibles desventajas cabe señalar que la luz ambiente o la propia fluorescencia de la muestra pueden interferir en muchos casos, o que los sensores ópticos poseen una estabilidad limitada (degradación).

Entre los ejemplos de aplicaciones prácticas de sensores ópticos podemos citar la determinación de los compuestos químicos que hay en la llama o el humo fruto de la

combustión, o bien el grado de maduración de los alimentos para controlar la calidad de los alimentos.

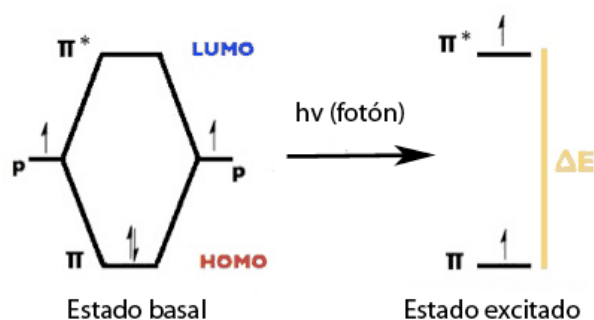
Los sistemas biológicos están compuestos por multitud de células bañadas en medio extracelular que se comunican entre sí y se coordinan para realizar ciertas funciones. Las células a su vez contienen diferentes organelas que juegan un papel esencial en el ciclo celular. Las moléculas o iones con absorciones ópticas características se denominan **cromóforos** (derivado del griego "que proporciona color"), y su presencia a menudo es la responsable del color de las sustancias (Atkins & de Paula, 2008). En los sistemas biológicos los cromóforos generalmente tienen máximos de absorción en el rango del UV lejano al visible. El color percibido por el ojo humano es aquel correspondiente con las longitudes de onda no absorbidas por un objeto al ser iluminado, es decir, el color se debe a la radiación electromagnética reflejada o transmitida. Esto es lo que ocurre en la clorofila (Fig. 2), la cual presenta un patrón de absorción mínimo en las longitudes de onda del verde y máximo en la región del azul y el rojo.



**Figura 2.** Espectro de absorción de la clorofila en el rango visible.

En química, el concepto de cromóforo es más amplio y se refiere a la parte de una molécula que es responsable de la absorción de radiación electromagnética mediante transición electrónica extendiéndose tanto a la luz visible como a la radiación ultravioleta e infrarroja. En otras palabras, el cromóforo es la parte de la molécula en la cual se produce la transición electrónica responsable de una determinada banda del espectro de absorción de una sustancia. En bioquímica se suele utilizar el concepto de cromóforo para referirse a las sustancias responsables de la absorción de energía lumínica y que participan en reacciones fotoquímicas. Por ejemplo, la clorofila sería el cromóforo que capta la energía de la radiación solar para la fotosíntesis en los vegetales. La radiación electromagnética se absorbe mediante una transición electrónica entre dos orbitales atómicos o moleculares. La diferencia de energía entre ambos orbitales se corresponde con las longitudes de onda absorbidas (Fig. 3).

La energía absorbida en la transición electrónica se libera rápidamente y el electrón pasa del estado excitado al estado fundamental u otro de menor energía. La energía puede ser liberada bien en forma de calor o mediante la emisión de radiación electromagnética. Esto es lo que ocurre en fenómenos de luminiscencia como la fosforescencia y la fluorescencia.



**Figura 3.** Estado excitado de los electrones al absorber energía. Donde HOMO hace referencia al orbital molecular ocupado de mayor energía, mientras que LUMO se refiere al orbital desocupado de menor energía.

Las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  y  $\pi \rightarrow \pi^*$  dan lugar a una buena parte de las aplicaciones de la espectroscopía de absorción UV-Visible en compuestos orgánicos, ya que las energías que se requieren para estos procesos dan lugar a bandas en una región espectral experimentalmente conveniente (200 a 700 nm). Ambas transiciones requieren la presencia de un grupo funcional que aporte orbitales tipo  $\pi$ . Hablando estrictamente, es a estos centros absorbentes insaturados a los que se aplica el término cromóforo.

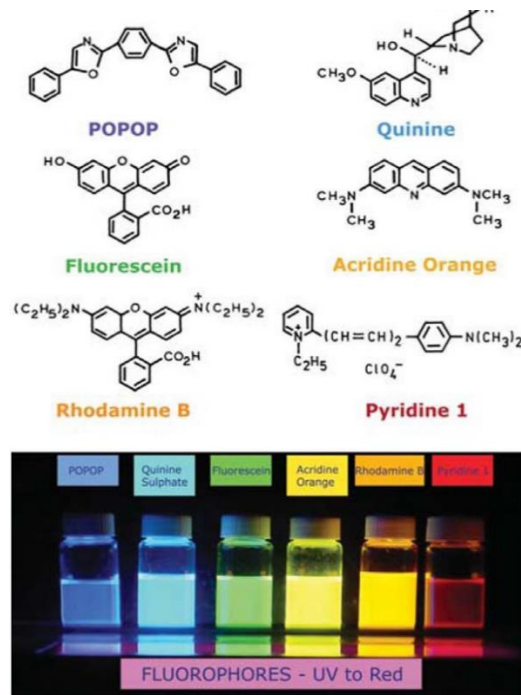
En la Fig. 4 mostramos colorantes empleados en microscopía confocal de fluorescencia y son habitualmente orgánicas. Una forma de marcado consiste en enlazar a una molécula de interés otra molécula que emita luz de una longitud de onda determinada al ser iluminado con contrsa otra, por lo general de mayor energía. Por ejemplo: la rodamina emite en el rojo al ser iluminada con luz verde.

Hay varios tipos de fluoróforos, a modo de ejemplo se citan algunos de los más relevantes:

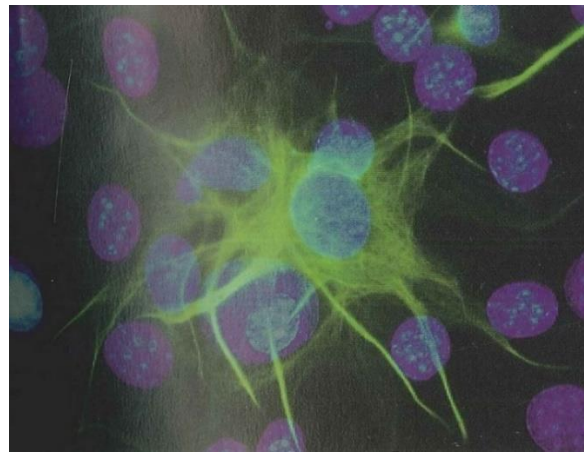
**-Moléculas orgánicas:** Los fluoróforos Alexa Fluor (derivados de la rodamina) han sido utilizados como marcadores de biomoléculas. La fotoestabilidad es una de las principales características de este tipo de colorantes, además barren todo el espectro.

**-Puntos cuánticos:** son nanocristales de semiconductores (2-50 nm) que al ser iluminados, emiten luz en una longitud de onda muy específica y que depende de su tamaño. A menor tamaño, menor es la longitud de onda emisión. Por ello la luz emitida pasa del azul al rojo a medida que el tamaño del punto se incrementa.

**-Proteicos:** Proteína fluorescente verde (GFP), posee un barril beta formado por 11 cadenas e incluye una hélice alfa central que atraviesa el barril en toda su longitud. En esta hélice hay tres aminoácidos consecutivos que forman un cromóforo natural, de forma que cuando la GFP es iluminada con luz ultravioleta, produce una brillante fluorescencia verde, como se puede apreciar en la Fig. 5. Es un marcador fluorescente muy común. Recientemente se ha propuesto como sensor óptico de temperatura en el rango 5 a 50 °C. (Nakano, M. *et al.*, 2017)



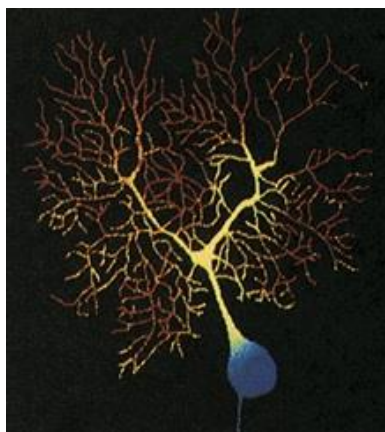
**Figura 4.** Diferentes tipos de fluoróforos, alguno de los cuales se ha estudiado en este trabajo.



**Figura 5.** Microscopia de fluorescencia de una proteína marcada con GFP. Los núcleos están teñidos de azul (Cariboni, A., 2004).

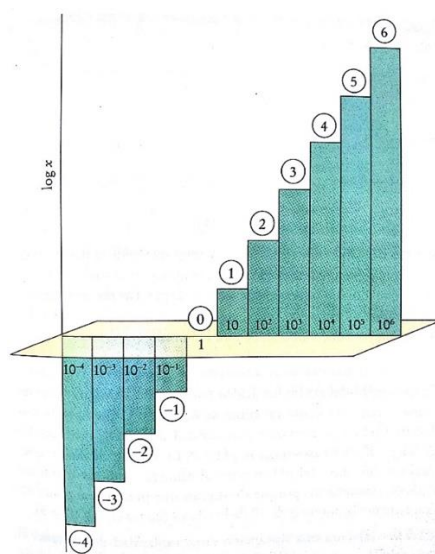
La mayoría de las unidades constitutivas de las proteínas y de los ácidos nucleicos no presentan una emisión muy intensa. Tenemos como excepciones, los aminoácidos triptófano ( $\lambda_{\text{abs}} \approx 280 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} \approx 348 \text{ nm}$  en agua), la tirosina ( $\lambda_{\text{abs}} \approx 274 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} \approx 303 \text{ nm}$  en agua) y la fenilalanina ( $\lambda_{\text{abs}} \approx 257 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} \approx 282 \text{ nm}$  en agua), y la forma oxidada de la secuencia serina-tirosina-glicina que se encuentra en la ya mencionada proteína fluorescente verde (GFP) de ciertas medusas. La forma nativa de la GFP de "Aequora victoria" absorbe fuertemente a  $395 \text{ nm}$  y tiene su máximo de emisión a  $509 \text{ nm}$  (Fig. 5). En la microscopía de fluorescencia, las imágenes celulares se generan mediante la unión de un gran número de moléculas fluorescentes a proteínas, ácidos nucleicos y membranas, y luego se visualiza la distribución de la intensidad de la fluorescencia dentro de un área iluminada (Fig. 6).





**Figura 6.** Visualización intracelular de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando un indicador fluorescente.

Algunos de los procesos más importantes de los sistemas químicos y biológicos son reacciones ácido-base en disolución acuosa. El **concepto de pH** lo propuso Sørensen en 1909 (Fochi, 2001). Al igual que le sucedió a Sørensen, puede ser necesario conocer la acidez de una disolución rápidamente de una forma que se reduzcan los errores. Sin embargo, las molaridades de  $\text{H}_3\text{O}^+$  y  $\text{OH}^-$  varían en muchos órdenes de magnitud; pueden llegar a ser de  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  y en otras sólo de  $10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$ .



**Figura 7.** La escala logarítmica permite, mediante órdenes de magnitud, representar amplios intervalos de una magnitud.

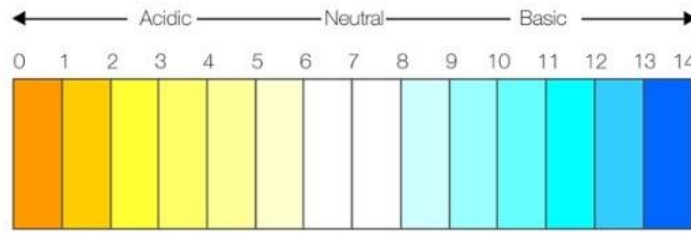
Los inconvenientes de tratar con números que se mueven en rango tan amplio de valores se evita empleando la escala logarítmica (Fig. 7). Por ello los químicos normalmente escriben las molaridades de los iones hidronio dando el pH de la solución,

$$\text{pH} = -\log[\text{H}_3\text{O}^+] \quad (1)$$

donde  $[\text{H}_3\text{O}^+]$  es la molaridad de los iones  $\text{H}_3\text{O}^+$ , con sus unidades de moles por litro omitidas. Por ejemplo, el pH del agua pura, completamente neutral, en la que la molaridad de los iones  $\text{H}_3\text{O}^+$  es de  $1 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  es

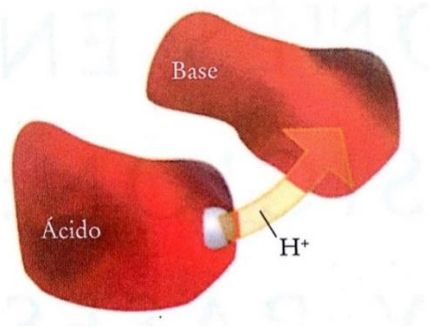
$$\text{pH} = -\log(10^{-7}) = 7 \quad (2)$$

El valor deseado del pH dependerá de lo que se desee lograr (Fig. 8):



**Figura 8.** El pH nos informa cuánto de ácida o básica (alcalina) es una sustancia. La escala de pH varía de 0 a 14, siendo el 0 el más ácido y el 14 el más básico.

Se define un **ácido de Brønsted** a una sustancia capaz de donar un protón, y una **base de Brønsted** como una sustancia que puede aceptar un protón (Fig. 9.). En general, estas definiciones son adecuadas para analizar las propiedades y las reacciones de los ácidos y las bases. Una extensión de la definición de Brønsted de ácidos y bases es el concepto de par ácido-base conjugado, que se define como un ácido y su base conjugada o como una base y su ácido conjugado. La base conjugada de un ácido de Brønsted es la especie que resulta cuando el ácido pierde un protón. A la inversa, un ácido conjugado resulta de la adición de un protón a una base de Brønsted. Todo ácido de Brønsted tiene una base conjugada y toda base de Brønsted tiene un ácido conjugado. Por ejemplo, el ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) es la base conjugada que se forma a partir del ácido  $\text{HCl}$ , y  $\text{H}_3\text{O}^+$  (ion hidronio) es el ácido conjugado de la base  $\text{H}_2\text{O}$ .



**Figura 9.** Un ácido de Brønsted es un dador de protones, y una base de Brønsted es un aceptor de protones. En este contexto, un protón es un ión  $\text{H}^+$ .

El pH de las células suele ser neutro, pero cada componente tiene el suyo propio para ocuparse de sus funciones. El núcleo tiene un pH ácido (ya que tiene ácidos nucleicos). En cada orgánulo hay variaciones de pH y podemos usar tinciones para diferenciar orgánulos con distinto valor de pH (*Cooper & Hausman, 2008*). La regulación de pH a nivel celular, es necesaria para la supervivencia celular.

Si hablamos del **pH extracelular**, el pH sanguíneo viene determinado por la concentración de protones  $[\text{H}^+]$  en sangre tomando un valor entre 7.35 y 7.45. Como consecuencia del propio metabolismo (catabolismo/anabolismo) se generan en exceso  $\text{H}^+$  (o lo que es lo mismo, acidez) y  $\text{CO}_2$ , que alteran el pH sanguíneo. Para compensar esta acidez el cuerpo tiene unos sistemas amortiguadores que neutralizan el exceso de ácido ( $\text{H}^+$ ), estos sistemas son moléculas tampón como el tampón fosfato, tampón bicarbonato y tampón hemoglobina, y actúan en determinados órganos que eliminan protones como son el riñón, el pulmón...

En lo que se refiere al **pH intracelular**, las células tienen un pH próximo a 7. En las células se dan todas las reacciones metabólicas que generan  $H^+$  como puede ser la glucólisis, gluconeogénesis, replicación, transcripción, traducción del DNA... Estos  $H^+$  han de ser tamponados, a través de proteínas y macromoléculas y así son eliminadas. (*Lehninger, Cox, & Nelson, 2006*)

Tanto el pH extracelular, como el pH intracelular funcionan en paralelo para neutralizar la acidez. El pH intracelular se mantiene gracias a:

- 1) La capacidad tamponadora de las proteínas libres y estructuras del citosol que secuestran  $H^+$ .
- 2) Proteínas transportadoras incrustadas en la membrana plasmática.

**Tabla 1.** pH de diferentes componentes celulares.

ELEMENTO	pH
Líquido extracelular	7.40
Sangre arterial	7.35
Sangre venosa	7.35
Líquido intersticial	7.35
Líquido intracelular	6.0 - 7.40
Orina	4.50 - 8.0
HCl gástrico	0.8

La carga de las biomoléculas, en especial de las proteínas de las que hablamos, depende del pH del medio en el que se encuentran puesto que su cadena principal tiene grupos ionizables (tienen un grupo carboxilo  $-COOH$  y uno amino  $-NH_2$ ), por ello decimos que tienen carácter anfótero y que pueden actuar como ácidos y como bases. El punto de pH donde el aminoácido tiene carga neta igual a cero se denomina punto isoelectrico.

Los aminoácidos ácidos tendrán los  $pH_i$  (isoelectricos) más bajos (por debajo de 3.5). Por el contrario, los aminoácidos básicos son los que tendrán  $pH_i$  más altos (por encima de 7.5). (*Voet, 2007*)

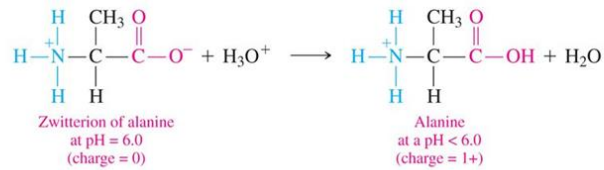
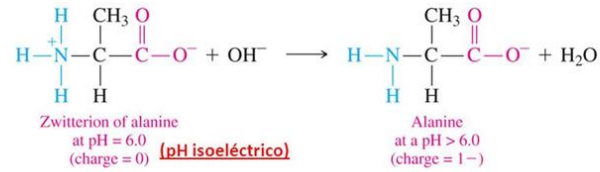
Dentro de la célula encontramos distintos orgánulos que tienen importantes funciones en el metabolismo tanto en la síntesis como degradación de proteínas, glúcidos y demás biomoléculas. Para desarrollar todas estas funciones también podemos definir a estos orgánulos por su determinado carácter ácido o básico. (*Stryer, 1990*)

**Mitocondrias:** En ellas se da el ciclo de Krebs punto clave del metabolismo de glúcidos y respiración celular esto genera muchos protones que hay que exportar (Fig. 10).

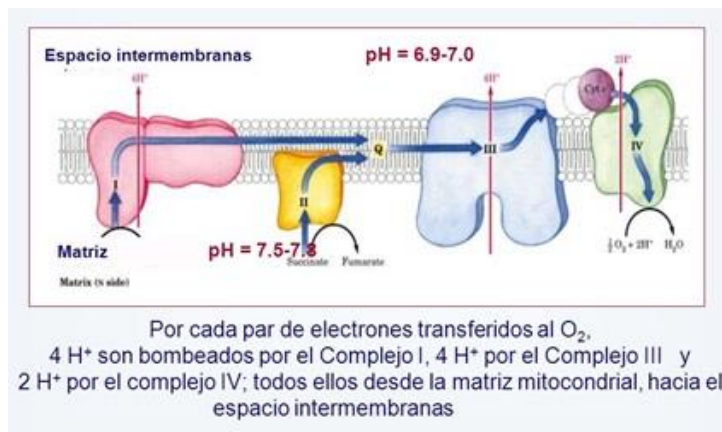
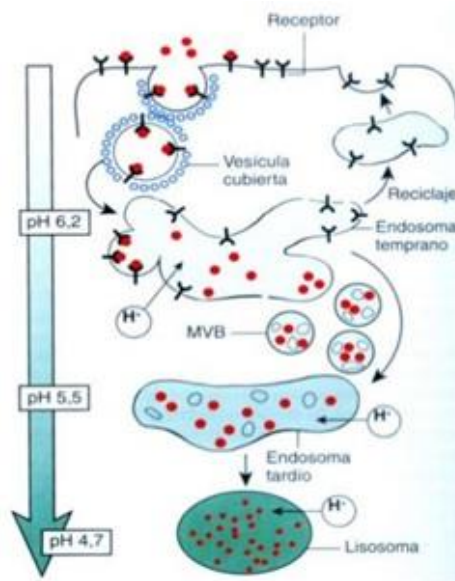
**Endosomas y lisosomas:** Su función es degradar material de desecho que no sirve a la célula por ello tienen un marcado carácter ácido (Fig. 11).

**Tabla 2.** Valores aproximados de pH isoelectrico para los diferentes tipos de aminoácidos.

AMINOACIDOS	pH isoelectrico aprox.
NEUTROS	4.8 - 6.3
ACIDOS	2.8 - 3.2
BASICOS	7.6 - 10.8



19

**Figura 10.** Translocación de  $\text{H}^+$  asociada al flujo de electrones mitocondrial.**Figura 11.** Variación del pH ácido para endosomas y lisosomas.

Los endosomas primarios se localizan cerca de la membrana plasmática. Sirven para canalizar el material endocitado y para devolver a dicha membrana sus porciones y los receptores traídos por las vesículas. Tienen un pH que varía de 6.2 a 6.5.

Los lisosomas son vesículas digestivas que brotan del aparato de Golgi, con 200-400 nm de diámetro, cargadas en enzimas activas en un pH ácido (alrededor de 5). Para esta función de digestión celular poseen en su membrana proteínas que bombean  $H^+$  y otras que permiten el transporte selectivo de moléculas sencillas tales como aminoácidos, monosacáridos, etc., producto de la digestión. (Teijon, 2006). El pH en el interior de los lisosomas es de 4.8 (bastante menor que el del citosol, que es neutro) debido a que las enzimas proteolíticas funcionan mejor con un pH ácido. La membrana del lisosoma estabiliza el pH bajo bombeando iones ( $H^+$ ) desde el citosol, asimismo, protege al citosol e igualmente al resto de la célula de las enzimas digestivas que hay en el interior del lisosoma.

Los estudios recientes vinculan de manera clara el **cáncer** y la **acidez**. Las células tumorales se dividen de una forma mucho más rápida que las normales, consumen nutrientes y metabolitos mucho más rápido (siendo el principal la glucosa), lo que produce una inhibición del ciclo de Krebs y de la fosforilación oxidativa en la mitocondria y una mayor producción de lactato. Este fenómeno bioquímico se ha denominado efecto Warburg. Se producen grandes cantidades de lactato en presencia de alto contenido de oxígeno. Una de las principales consecuencias de este fenómeno es **la alta producción de protones**. Al acidificar el pH podría perjudicarse la actividad enzimática de diferentes proteínas, afectando al metabolismo. Las células tumorales poseen un control del transporte de protones y un balance ácido-base desregulado en comparación con las células normales. Se sabe que las células tumorales poseen valores de pH intracelular alcalinos que van desde 7.2 a 7.7 mientras que las células normales exhiben valores más bajos de 6.9 a 7.1. Además, las células **tumorales** poseen un pH extracelular más ácido que el normal, bordeando valores entre **6.2** y **6.9** mientras que en células **normales** el pH se mantiene en valores más alcalinos entre **7.3** y **7.4**.

La diferencia en los valores del  $pH_i$  y  $pH_e$  crea una gradiente de pH a través de la membrana plasmática, este gradiente es capaz de alterar el funcionamiento y metabolismo normal de la célula, promoviendo la malignidad tumoral. (Horton, 2008) Las células tumorales se encargan de secretar el exceso de protones al medio extracelular, lo cual aumenta según la agresividad del tumor y la disponibilidad de oxígeno. El aumento en la concentración de protones en el medio intracelular activaría transportadores de  $H^+$  y enzimas responsables de la regulación del  $pH_i$  en las células tumorales, para compensar y alcalinizar el citosol intracelular, expulsando los  $H^+$  hacia el medio extracelular. Como resultado, se genera un **microambiente tumoral ácido extracelular** debido al mal tamponamiento de los protones excretados.

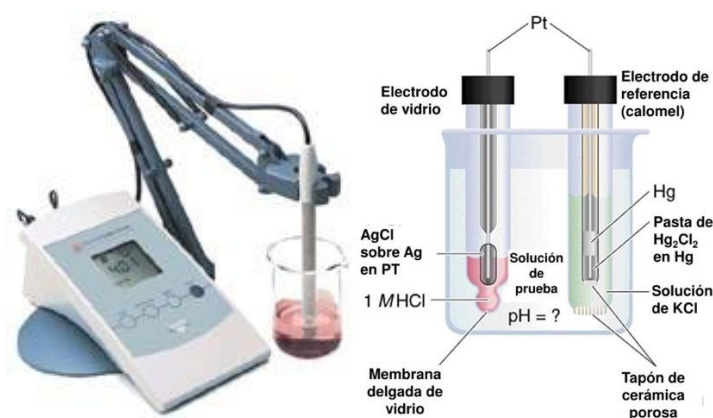
Una alternativa que se ha planteado en respuesta al pH extracelular ácido que presentan las células tumorales, es utilizar partículas de diferentes polímeros que contengan drogas quimioterapéuticas y que sirvan para entregarlas y activarlas de forma específica en zonas con pH ácido. Lo anterior haría que las drogas quimioterapéuticas no se activen en zonas donde posiblemente no exista un tumor, disminuyendo los efectos adversos de la quimioterapia. (Murray, 2007)

### 1.1. Estado del arte

Los métodos de medida del pH básicamente se dividen en dos: Método potenciométrico y los indicadores de pH.

#### 1.1.1. Método ponteciométrico: pH-metro

Un pH-metro es un instrumento que mide el pH de una disolución, y sirve para detectar el punto final de una valoración ácido-base (Fig. 12.a). El pH-metro es un potenciómetro que mide la fuerza electromotriz de una pila electroquímica formada por un electrodo combinado introducido en la disolución problema. El circuito eléctrico se cierra a través de un milivoltímetro capaz de medir el potencial de la pila así construida en voltios o directamente en unidades de pH. Los pH-metros miden la diferencia de potencial que existe entre dos electrodos, de los cuales uno de ellos es sensible a los iones hidrogeno  $H^+$  (el más usado es el electrodo de vidrio) y el otro es un electrodo de referencia, un electrodo de calomelanos (mineral formado por cloruro de mercurio,  $Hg_2Cl_2$ ). El electrodo de vidrio está constituido por un bulbo formado por una lámina muy fina de vidrio, y dentro del bulbo se encuentra una solución de pH conocido y un elemento medidor formado por un alambre de plata recubierto de AgCl. Hoy día, el electrodo de vidrio y el de referencia se encuentran montados en un mismo cuerpo (Fig. 12.b)



**Figura 12.** a) pH-metro de mesa para las pruebas de laboratorio (izq.). y b) Electrodos para la medición del pH (dcha.).

#### 1.1.2. Indicadores de pH o indicadores acido-base

Se pueden presentar en forma de solución o bien, impregnados en papel o en forma de tira reactiva.

##### *Papeles indicadores y tiras rígidas indicadoras de pH*

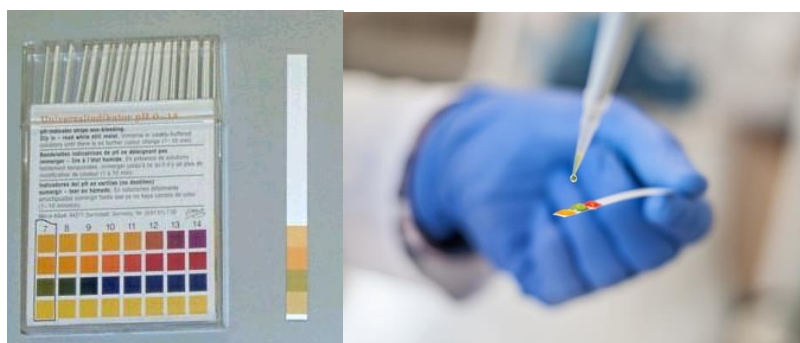


Una forma de medir el pH es con métodos de coincidencia de colores, los denominados "test de pH". En ellos englobamos las tiras de papel o los *test kits*. Como papeles indicadores conocidos destacamos el papel de tornasol azul, el papel de tornasol rojo, el amarillo brillante, el rojo Congo o el papel indicador universal. El papel indicador universal es una tira de papel impregnada de una mezcla de indicadores que dan como resultado un color preciso para ciertos valores de pH, por lo que se puede medir en una disolución sin más que comparar el color obtenido al añadir una gota de disolución con el de referencia que viene en la caja, como la que se observa en la Fig. 13.



**Figura 13.** Escala del indicador universal (Zumdahl, 1992)

El sensor de pH más conocido tal vez sea la “tira de pH” (Fig. 14). Se trata de una tira de papel o plástico que tiene impregnado un indicador, el cual hace que la tira cambie de color según el valor de pH del analito. Es un método simple, barato y rápido. Como contrapartida no permite un funcionamiento automático y es poco preciso (1 unidad de pH)



**Figura 14.** Papeles indicadores y tiras rígidas indicadoras de pH.

Ambos métodos dan resultados basados en una reacción química que resulta en un cambio de color. Son sencillos y económicos, pero carecen de precisión. Factores como la antigüedad del kit, su exposición al aire, la luz solar o temperaturas extremas, afectan al resultado de la lectura.

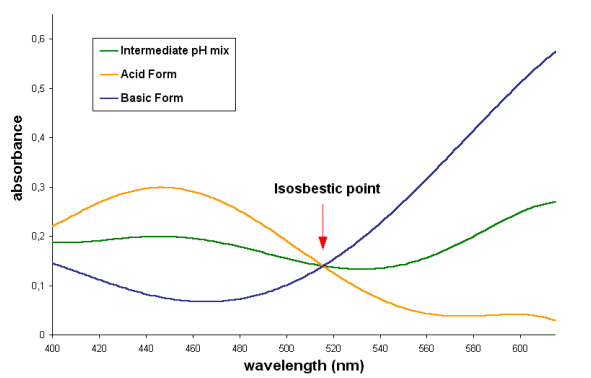
### **Indicadores líquidos**

Son ácidos y bases orgánicas débiles, que son muy sensibles a otros ácidos y bases, y toman un color diferente según el pH del medio que los contenga, ya que su estructura química varía ligeramente. (Fig. 15).



**Figura 15.** Medida del pH de una disolución de Naranja de Metilo en su forma ácida (color rojo), tomada mediante elaboración propia en la realización de este trabajo.

Los indicadores de neutralización cambian de color por la introducción de iones  $H^+$  u  $OH^-$  en sus soluciones. Este cambio de color al variar el pH se denomina halocromismo. Se puede afirmar, entonces, que el color de un indicador depende de su pH y en consecuencia los indicadores pueden ser descritos como indicadores de pH. La relación entre el color de un indicador de pH particular y el pH de la solución puede ser establecido con la ayuda de la teoría cromófora de indicadores (*Alexeyev, 1986*). El cambio de color se debe a un cambio estructural en la molécula inducido por la protonación o desprotonación de la especie que afectan al cromóforo (Fig. 16).



**Figura 16.** Espectro de absorbancia del verde de bromocresol para las formas ácida, básica e intermedia. Se añade además el punto isobéptico.

Se han sintetizado sustancias orgánicas que reaccionan al contacto con otras de características ácidas o básicas, produciendo color en rangos de pH específicos, como los indicados en la Fig. 17.

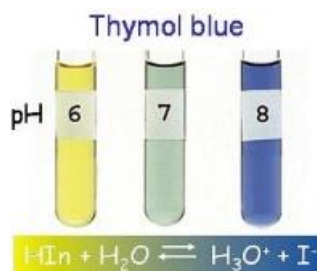
Los indicadores ácido-base tienen un intervalo de viraje de unas dos unidades de pH, en la que cambian la disolución en la que se encuentran de un color a otro, o de una disolución incolora, a una coloreada (*Gómez Sosa, 2010*). El intervalo de pH en el que el color cambia se llama intervalo de transición.



Indicadores	Color ácido	pH Viraje	Color básico
Amarillo de alizarina GG	Amarillo claro	10 – 12,1	Rojo castaño
Azul de bromotoluenol	Amarillo	3 – 4,6	Violeta
Azul de bromotimol	Amarillo	6 – 7,6	Azul
fenolftaleína	Incoloro	8,2 – 9,8	Violeta / rosa
M - cresolpúrpura	Amarillo	7,4 – 9	Púrpura
Naranja de metilo	Rojo	3,1 – 4,4	Amarillo naranja
Púrpura de bromocresol	Amarillo	5,2 – 6,8	Púrpura
Rojo congo	Azul violeta	3 – 5,2	Rojo naranja
Rojo de bromo fenol	Naranja amarillo	5,2 – 6,8	Púrpura
Rojo de cresol	Amarillo	7 – 8,8	Púrpura
Rojo de fenol	Amarillo	6,4 – 8,2	Rojo
Rojo de metilo	Rojo	4,4 – 6,2	Amarillo naranja
Rojo neutro	Azul rojizo	6,4 – 8	Naranja amarillo
Timolftaleína	Incoloro	8,6 – 10	Azul
Tornasol	Rojo	5 – 8	Azul
Violeta de metilo	Amarillo	0,1 – 1,6	Azul / violeta
4 – dimetilaminobenzol	Rojo	2,9 – 4	Amarillo naranja
(F) Esculina	Índigo débil	1 – 1,5	Azul intenso
(F) Beta – naftilamina	Incoloro	2,8 – 4,4	Violeta
(F) Alfa – naftilamina	Incoloro	3,4 – 4,8	Azul
(F) Fluoresceína	Azulado	3,8 – 4,3	Azul intenso
(F) Eosina	Incoloro	3,9 – 4,5	Amarillo naranja
(F) Eritrosina	Incoloro	3,7 – 4,6	Amarillo verdoso
(F) Acridina	Verde	5,3 – 6,4	Violeta
(F) Umbeliferona	Incoloro	6,2 – 8,3	Azul intenso
(F) Cumarina	Incoloro	9,2 – 10,5	Verde amarillo
(F) Beta-metil umbeliferona	Índigo débil	6,9 – 7,1	Azul intenso

**Figura 17.** Algunos indicadores con su respectivo rango de viraje en pH y color producido.

El indicador más adecuado será aquel que presenta un intervalo de viraje reducido y sufre un cambio de color más nítido dentro de la escala de pH donde se trabaja (Fig.18).



**Figura 18.** Indicador de pH (Azul de Timol) en términos de una reacción ácido-base.

En este trabajo se va a utilizar la espectroscopía para dar un valor más aproximado del pH.

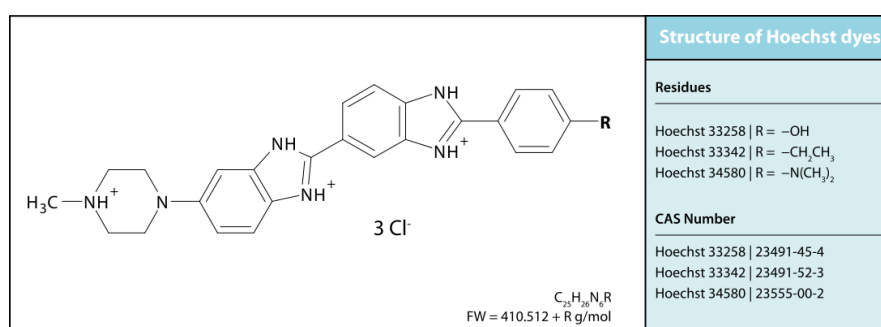
## 2. Procedimiento experimental: Materiales y métodos.

### 2.1. Materiales

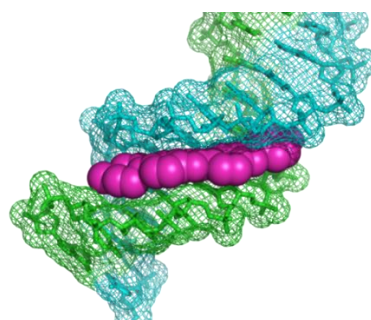
Es posible marcar las distintas partes de la célula mediante colorantes con afinidad por los diferentes componentes celulares, para que bajo una excitación de longitud de onda adecuada éstos emitan en una longitud de onda específica. Por ejemplo, para resaltar el núcleo, se puede usar el colorante Hoechst 33258, que se une a la doble hélice de ADN y emite en el azul ( $\lambda_{\text{em}} = 461 \text{ nm}$ ) al excitarse en el UV ( $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ ).

### 2.1.1. Hoechst 33258

El nombre Hoechst hace referencia a una colección de colorantes fluorescentes marcadores del ADN que se emplean en la microscopía de fluorescencia (Fig. 19). Estos marcadores son parte de una familia de colorantes fluorescentes azules utilizados para teñir el ADN (*Latt, Stetten, Juergens, Willard & Scher, 1975*). Su composición química es de bisbenzimidaz, que tienden a unirse a la doble cadena en regiones del ADN ricas en AT (Adenina-Timina) (Fig. 20). Este tipo de tinción es útil en experimentos en los que se usan diferentes fluoróforos, ya que existe una gran diferencia entre sus longitudes de onda de excitación y las de las correspondientes emisiones. Una de las aplicaciones más importantes, que enlaza con nuestro estudio, es la determinación cuantitativa del contenido de ADN celular en medidas de citometría de flujo. Para realizar la tinción del núcleo celular con Hoechst, es necesario utilizar guantes durante el proceso, debido a que estos tintes se unen al ADN, interfiriendo con la replicación del ADN durante la división celular. En consecuencia, son potencialmente mutagénicos y carcinogénicos, por lo que se debe tener cuidado en su manipulación y eliminación.



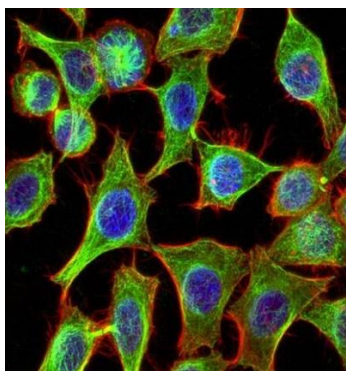
**Figura 19.** Estructura de las diferentes tinciones Hoechst.



**Figura 20.** Hoechst 33258 (magenta) unido al surco menor del ADN (verde y azul). Imagen del Protein Data Bank (PDB)

Estos colorantes fueron desarrollados originalmente por la compañía química alemana Hoechst AG. Por su capacidad de tinción de ADN, el Hoechst también se emplea para visualizar núcleos y mitocondrias. Otra ventaja de estos tintes es que son permeables a la membrana celular y puede usarse para teñir tanto células vivas como fijadas, y se emplean a menudo en sustitución de otro tinte de ácidos nucleicos, el DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), que es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN. El DAPI no puede atravesar la membrana celular, por lo que únicamente se utiliza para teñir células muertas. La diferencia entre ambos, radica en el grupo etilo adicional del Hoechst

33342, que le da un comportamiento más lipófilo, por lo que puede atravesar más fácilmente la membrana celular.



**Figura 21.** Imagen de microscopía confocal de fluorescencia de células HeLa. En azul los núcleos teñidos con Hoechst, en verde los microtúbulos y en rojo la membrana plasmática.

Dentro de sus características moleculares, se sabe que tanto Hoechst 33258 como Hoechst 33342 son excitados por luz ultravioleta de longitud de onda  $\lambda_{exc} = 351\text{-}364\text{ nm}$ , y ambos emiten luz azul/cian de máximo de longitud de onda a  $\lambda_{em} = 461\text{ nm}$  (Fig .21).

### Disoluciones

Para realizar los estudios de concentración y pH empezamos haciendo una disolución de partida en agua destilada. Para ello pesamos la muestra que tomamos de Hoechst 33258,  $m_H = 20.0 \pm 0.1\text{ mg}$ . La masa de agua que añadimos fue de  $M_A = 20.000\text{ g}$ .

Para conseguir varias muestras a distintas concentraciones se diluyó la concentración inicial, tomando cada vez que se hace, una parte de cromóforo en disolución y dos de agua. Dichas disoluciones se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Diferentes diluciones de colorante Hoechst y su fracción correspondiente respecto de la mezcla inicial.

MUESTRA HOECHST	FRACCIÓN RESPECTO DE LA INICIAL
H <sub>1</sub>	H <sub>1</sub>
H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> /3
H <sub>3</sub>	H <sub>1</sub> /9
H <sub>4</sub>	H <sub>1</sub> /27
H <sub>5</sub>	H <sub>1</sub> /81
H <sub>6</sub>	H <sub>1</sub> /243
H <sub>7</sub>	H <sub>1</sub> /729

Una vez preparadas estas muestras, se obtienen otras nuevas disoluciones intermedias mezclando distintas proporciones de las primeras y de agua, como se recoge en la Tabla 4. Dichas disoluciones son H<sub>3-5</sub> (una parte de H<sub>3</sub>, otra de H<sub>5</sub> y dos de agua), H<sub>4-7</sub> (una parte de H<sub>4</sub>, una de H<sub>7</sub> y otra de agua), H<sub>6(a)</sub> (dos partes de H<sub>6</sub> y dos de agua), H<sub>6(b)</sub> (una parte de H<sub>6(a)</sub> y tres de agua) y H<sub>3-5-6(a)</sub> (una parte de H<sub>3-5</sub>, una de H<sub>6(a)</sub> y otra de agua).

**Tabla 4.** Se añaden, a las de la Tabla 3, las diluciones intermedias y su fracción respecto de la inicial.

MUESTRA HOECHST	FRACCIÓN RESPECTO DE LA INICIAL
H <sub>1</sub>	H <sub>1</sub>
H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> /3
H <sub>3</sub>	H <sub>1</sub> /9
H <sub>4</sub>	H <sub>1</sub> /27
H <sub>3-5</sub>	5H <sub>1</sub> /243
H <sub>5</sub>	H <sub>1</sub> /81
H <sub>4-7</sub>	7H <sub>1</sub> /729
H <sub>3-5-6(a)</sub>	4H <sub>1</sub> /729
H <sub>6</sub>	H <sub>1</sub> /243
H <sub>7</sub>	H <sub>1</sub> /729
H <sub>6(a)</sub>	H <sub>1</sub> /729
H <sub>6(b)</sub>	H <sub>1</sub> /2916

A partir de los datos de las Tablas 3 y 4 se obtienen las concentraciones correspondientes de cada una de las muestras a partir de la ec. (3):

$$C = \left( \frac{\text{masa del soluto}}{\text{volumen de la disolución}} \right) \quad (3)$$

La Tabla 5 muestra los valores de las concentraciones de Hoechst para las distintas disoluciones:

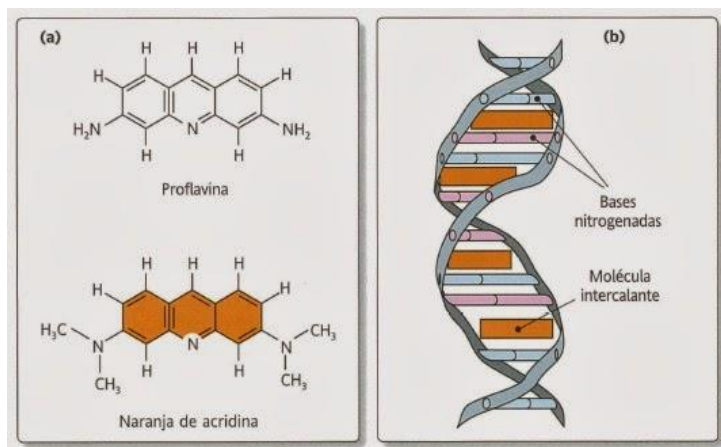
**Tabla 5.** Diferentes muestras de colorante Hoechst con sus respectivas concentraciones en g/L.

MUESTRA HOECHST	CONCENTRACIÓN (g/L)
H <sub>1</sub>	1.070
H <sub>2</sub>	0.3567
H <sub>3</sub>	0.1189
H <sub>4</sub>	0.0396
H <sub>3-5</sub>	0.0220
H <sub>5</sub>	0.0132
H <sub>4-7</sub>	0.0102
H <sub>3-5-6(a)</sub>	0.0058
H <sub>6</sub>	0.0044
H <sub>7</sub>	0.0015
H <sub>6(a)</sub>	0.0015
H <sub>6(b)</sub>	0.0004

### 2.1.2. Naranja de Acridina

El naranja de acridina (o N,N,N',N'-tetrametilacridina según IUPAC) es un colorante catiónico selectivo para los ácidos nucleicos perteneciente al grupo de los colorantes de acridina. Son generalmente de color amarillo y naranja. El naranja de acridina es un indicador de pH fluorescente, de color naranja a pH 8.4 y presenta una fluorescencia verde a pH 10.4 (*Boca Ratón, 1993*). Los colorantes de acridina son ampliamente utilizados en el campo de la impresión, tinción, cuero y litografía (*Xie Y. Chen F, He J, Zhao J, Wang H. J, 2000*). Es un producto sanitario para el diagnóstico *in vitro* y para el diagnóstico del ciclo celular en la medicina humana y además, se emplea en el examen citológico de muestras de origen humano. Existen además numerosos procedimientos de tinción como colorante fluorescente para visualizar y diferenciar estructuras ricas en ADN y ARN

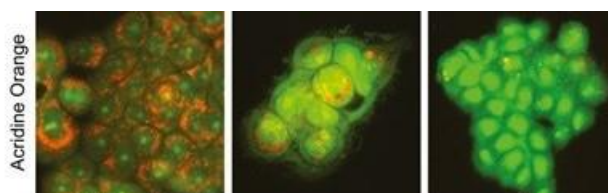
(Traganos, F., et al., 1977). Interacciona con el primero por intercalación dentro de la molécula y con el segundo por atracción electrostática. Es además un mutágeno, debido a que estos tipos de compuestos orgánicos se unen al ADN y se intercalan en su estructura de doble cadena, produciendo interrupciones locales del emparejamiento de las bases nitrogenadas (Fig. 22). Estas interrupciones resultan en adiciones o deleciones en la siguiente ronda de replicación.



**Figura 22.** a) Estructura del Naranja de Acridina, b) Agentes intercalantes insertados entre las bases nitrogenadas que componen el ADN.

Este colorante se utiliza frecuentemente en microscopía de epifluorescencia y se emplea conjuntamente con el bromuro de etidio para diferenciar entre células vivas y apoptóticas como una tinción de viabilidad (Geng, Y. J., et al., 1996). También tiñe selectivamente las células tumorales y retarda el crecimiento del tumor.

El resultado de su acción es una fluorescencia de color verde a verde amarillenta en estructuras que contienen ADN, tales como núcleos, cromosomas, inclusiones virales, etc., presentado un máximo de excitación a 502 nm y de emisión a 525 nm (Fig. 23). Presenta una fluorescencia roja en estructuras que contienen ARN, tales como ribosomas, nucléolos, inclusiones virales, mucosidad ácida, gránulos de mastocitos, etc., donde la excitación máxima deriva a 460 nm (en el azul) y la emisión máxima a 650 nm (en el rojo). Por lo tanto, este colorante tiñe de verde a las células en fase de división activa (mucho ADN), y de naranja a las que están en reposo multiplicativo (mucho ARN y proteínas).



**Figura 23.** Imagen confocal fluorescente mediante el uso de tinción con Naranja de Acridina (2 µg/mL) para la integridad lisosomal en células pancreáticas malignas.

Los colorantes de acridina utilizados en este estudio fueron adquiridos a Sigma-Aldrich y fueron usados sin ningún tratamiento previo.

### Disoluciones

Comenzamos, de igual forma que con el Hoechst 33258, haciendo una disolución de partida en agua destilada (Fig. 24). Pesamos la muestra de naranja de acridina  $m_{AO} \approx 25$  mg, para un volumen de agua destilada de  $M_A = 25$  mL.

Masa de Acridine Orange,  $m_{AO} = 24.926 \pm 0.001$  mg

Concentración inicial,  $c_i \approx 997 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$



**Figura 24.** Matraz aforado con la disolución de partida de Naranja de Acridina.

Para conseguir varias muestras a distintas concentraciones de Naranja de Acridina, se fue diluyendo la concentración inicial, tomando cada vez una parte de cromóforo en disolución y varias de agua (Tabla 6).

**Tabla 6.** Disoluciones de naranja de acridina, su fracción correspondiente respecto de la mezcla inicial y su concentración en  $\mu\text{g/L}$ .

MUESTRA NARANJA DE ACRIDINA	FRACCIÓN RESPECTO DE LA INICIAL	CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g/L}$ )
NA <sub>1</sub>	3/16	186.8
NA <sub>2</sub>	1/8	124.5
NA <sub>3</sub>	1/12	83.0
NA <sub>4</sub>	1/16	62.2
NA <sub>5</sub>	1/32	31.1
NA <sub>6</sub>	1/64	15.6
NA <sub>7</sub>	1/128	7.8

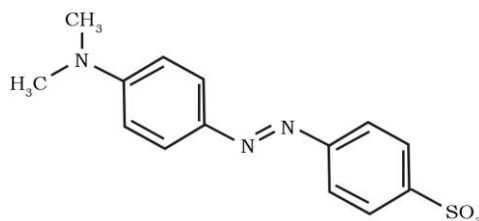
#### 2.1.3. Naranja de Metilo

El compuesto sintético naranja de metilo es un colorante azoderivado ampliamente usado en la industria, y un indicador de pH con cambio de color de rojo a naranja-amarillo entre pH 3.1 y 4.2. Con este nombre se conoce a la sal sódica de ácido sulfónico de 4-Dimetilaminoazobenceno (Fig. 25) y cuya fórmula química es  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{NaO}_3\text{S}$  (peso molecular  $\text{PM} = 327.34$  g/mol).

Se empezó a usar como indicador químico en 1878. El naranja de metilo es un compuesto muy estable, es resistente a la biodegradación y se utiliza de forma habitual en la industria



textil. En la actualidad se registran muchas aplicaciones desde preparaciones farmacéuticas, colorantes de teñido en telas y plásticos. Se suele aplicar en citología en conjunto con la solución de Fuschin.



**Figura 25.** Estructura del Naranja de metilo.

Debido a la estructura que estos tintes poseen, se caracterizan por una alta solubilidad en agua. El naranja de metilo se adquirió de la empresa Sigma Aldrich (Fig. 26).



**Figura 26.** Muestra de Naranja de Metilo en forma de polvo.

### **Disoluciones:**

Se procede a la preparación de diez disoluciones patrón de colorante naranja de metilo a partir de una disolución concentrada del colorante en agua destilada, que se proporciona ya preparada (Fig. 27). Con los datos que poseemos de ella: Molaridad,  $1.22 \text{ Mm} = 1.22 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$  y peso molecular,  $PM = 327.4 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ , obtenemos la concentración inicial de partida en dicha muestra de naranja de metilo:  $C_i = 0.399428 \frac{\text{g}}{\text{L}}$ , resultando casi  $0.40 \text{ g/L}$ .

Se obtuvieron varias muestras a diferentes concentraciones de naranja de metilo. En la tabla 7 se puede ver un cuadro resumen de todo este proceso de diluciones.



**Figura 27.** Matraz aforado con nuestra disolución de partida de Naranja de Metilo.

**Tabla 7.** Diferentes disoluciones de colorante naranja de metilo, su fracción correspondiente respecto de la mezcla inicial y su concentración en  $\mu\text{g/L}$ .

MUESTRA NARANJA DE METILO	FRACCIÓN RESPECTO DE LA INICIAL	CONCENTRACIÓN (µg/L)
NM <sub>1</sub>	1/4	99857.1
NM <sub>2</sub>	1/8	49928.5
NM <sub>3</sub>	1/16	24964.2
NM <sub>4</sub>	1/20	19971.4
NM <sub>5</sub>	3/80	14978.5
NM <sub>6</sub>	1/30	13314.3
NM <sub>7</sub>	1/40	9985.7
NM <sub>8</sub>	1/60	6657.1
NM <sub>9</sub>	1/64	6241.1
NM <sub>10</sub>	1/100	3994.3

## 2.2. Métodos

Se describen los procedimientos y técnicas experimentales para la caracterización de las muestras. Detallamos las técnicas espectroscópicas de absorción UV-Vis, de fotoluminiscencia y excitación de la fluorescencia, así como la medida de los tiempos de vida de los estados de emisión, introduciendo los fundamentos de las mismas. Además veremos la instrumentación para determinar el pH de todas nuestras muestras.

### 2.2.1. Técnicas espectroscópicas

Todas las técnicas o métodos espectroscópicos de análisis se basan en la absorción de luz y su posterior emisión a distinta energía por los colorantes mencionados previamente.

#### *Absorción UV-Visible*

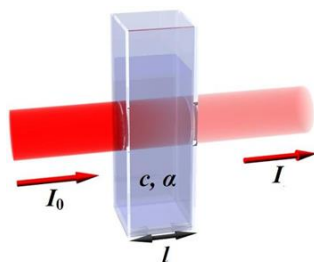
La espectroscopía de absorción es la técnica básica para la caracterización óptica de materiales y disoluciones en la región ultravioleta-visible del espectro. Consiste en la medida de la atenuación (fracción de la intensidad que ha sido absorbida) de luz al pasar a través del material en función de la longitud de onda de la radiación incidente. Esta atenuación es debida a transiciones desde el estado fundamental a estados excitados del material. La principal desventaja es que no se trata de una técnica selectiva.

La Ley de Lambert-Beer es una relación empírica que relaciona la luz absorbida con las propiedades del material. Si se hace incidir radiación monocromática sobre una muestra (medio homogéneo) con una concentración  $c$  de una sustancia que absorbe a esa longitud de onda  $\lambda$ , la intensidad de la radiación que la atraviesa,  $I$ , está relacionada con la intensidad incidente  $I_0$  y con el espesor de la muestra,  $l$ , por la siguiente expresión:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\alpha l} \quad (4)$$

donde  $\alpha = \varepsilon c$  es el coeficiente de absorción y dependen del material y de la longitud de onda y de  $\varepsilon$ , el coeficiente de extinción molar. Así, el haz de luz que sale tras atravesar el medio tiene una intensidad menor que la del haz incidente. La intensidad de la radiación disminuye exponencialmente con el espesor de la muestra  $l$  y la concentración  $c$  de la especie absorbente.





**Figura 28.** Atenuación de un haz de luz de intensidad  $I_0(\lambda)$  cuando se transmite a través de una muestra de espesor  $l$ . La intensidad transmitida  $I(\lambda)$  es menor que la incidente  $I_0(\lambda)$ .

Operando con la ec. (4) se tiene

$$-\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon l c \quad (5)$$

Habitualmente, el cociente  $\frac{I}{I_0}$  se denomina transmitancia  $T = \frac{I}{I_0}$  de la muestra y se suele expresar como porcentaje de luz transmitida:  $\%T = \frac{I}{I_0} \cdot 100$  (6)

Por otra parte, se define la absorbancia de la muestra como:  $A = -\log T$  (7)

Así, la absorbancia se determina como el logaritmo del cociente entre la luz incidente  $I_0$  y la transmitida  $I$ :  $A = -\log \frac{I}{I_0}$  (8)

Tanto la absorbancia como la transmitancia son magnitudes que se obtienen directamente en el espectrofotómetro. Según estas definiciones, queda finalmente la siguiente expresión que se conoce con el nombre de la ley de Lambert-Beer:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\alpha l} = I_0 \cdot 10^{-A} \quad (9)$$

donde la absorbancia  $A(\lambda)$  se obtiene directamente del equipo y depende de la longitud de onda  $\lambda$ . Si se opera, por tanto, a una longitud de onda dada y con una cubeta de un determinado espesor,  $l$ , la absorbancia  $A$ , es proporcional a la concentración molar de la muestra,  $c$ , lo que constituye el fundamento del análisis espectrofotométrico cuantitativo.

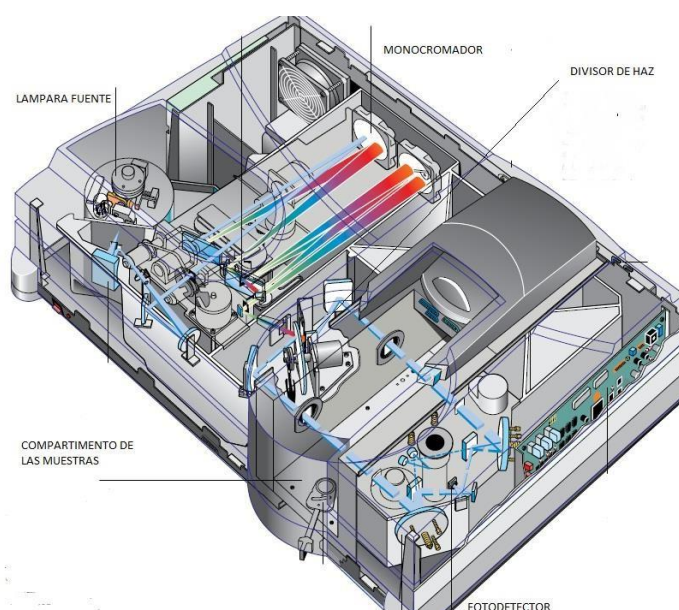
Existen, sin embargo, distintos factores que afectan al cumplimiento de la ley de Lambert-Beer, especialmente a concentraciones elevadas. Por ello antes de proceder al análisis de una muestra es preciso comprobar experimentalmente el rango de concentraciones en que dicha ley se cumple, obteniendo la curva de calibrado que relaciona la absorbancia a una determinada longitud de onda con la correspondiente concentración (*Miñones, J., 1978*).

Las medidas de la intensidad del haz de luz,  $I_0(\lambda)$  e  $I(\lambda)$ , es decir las medidas de absorción, se realizaron de manera simultánea con el espectrofotómetro de doble haz Cary 6000i de la compañía Varian (Fig. 29).

Un espectrofotómetro es un instrumento capaz de comparar la radiación emitida y la absorbida por una solución que contiene una cierta cantidad de soluto. La absorción de las radiaciones UV, visibles e IR depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química. En la Fig. 30 se muestra un esquema del equipo empleado.



**Figura 29.** Espectrofotómetro Cary 6000i Varian usado para obtener los espectros de absorción de las distintas disoluciones.



**Figura 30.** Esquema del espectrofotómetro Cary 6000i.

Este equipo dispone de dos lámparas (una halógena para el VIS/IR y una de deuterio para el UV) como fuentes de luz, un doble monocromador, que controla la longitud de onda de la radiación que se hace incidir sobre la muestra, y dos detectores (un fotomultiplicador para el UV/VIS y un detector de InGaAs para el IR) (Villanueva, 2012). Trabaja en el rango entre 170 y 1800 nm y permite acoplar una esfera integradora.

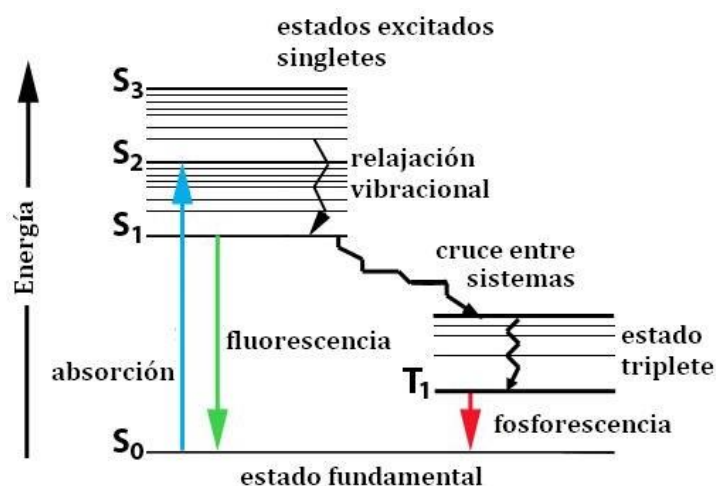
### **Fluorescencia**

La microscopía de fluorescencia es una herramienta utilizada en muchas áreas de la biología celular. En general, cuando una sustancia absorbe radiación UV-Vis también puede perder ese exceso de energía adquirido en forma de calor, vibraciones, rotaciones, o colisiones con otros átomos o moléculas; hay compuestos en los que la pérdida de energía tiene lugar emitiendo radiación de  $\lambda$  mayor. Este fenómeno se conoce como **fotoluminiscencia**. Según como sea la emisión de radiación, se distinguen distintos procesos luminiscentes: **fluorescencia o fosforescencia**. Aunque la diferencia entre ellos se da en relación con la multiplicidad de los orbitales, en la práctica se distinguen, en la mayoría de los casos, por el tiempo que transcurre entre la absorción y la emisión. La diferencia entre ambos fenómenos luminiscentes radica en el tiempo de emisión de

radiación. La fluorescencia es un proceso muy rápido que tiene lugar en  $10^{-11}$ - $10^{-9}$  s, la fosforescencia es notablemente más lenta (generalmente superior a los ms) y que está relacionada con la regla de la conservación del espín en la transición. Así las transiciones permitidas tienen tiempos de vida inferiores (fluorescencia) a los de las transiciones prohibidas (fosforescencia) (Lacowicz, J. R. 1999). La fluorescencia es un proceso de interacción entre la radiación y la materia en el cual un material absorbe radiación de una fuente de luz y, por lo general, emite muy rápidamente luz de menor energía (mayor longitud de onda) que la de la radiación que ha absorbido (fenómeno conocido como desplazamiento de Stokes).

La excitación puede ser inducida por luz (fotoluminiscencia), mediante una reacción química (quimio-luminiscencia), mediante un campo eléctrico (electroluminiscencia), etc.

La fluorescencia nos sirve, como ya sabemos, para visualizar partes de la célula como son la membrana plasmática, el núcleo, las vacuolas, el retículo endoplásmico, etc. También para estudiar procesos celulares tales como la división celular, muerte celular, cambios en el potencial de membrana, etc. Igualmente podemos localizar moléculas específicas: proteínas, lípidos, etc. y diferenciar partículas muy pequeñas que por otros métodos no se resolverían. Inclusive estudiar la interacción entre moléculas *in vivo*.



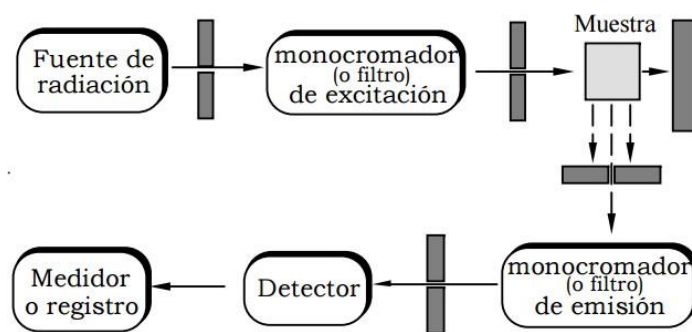
**Figura 31.** Diagrama de Jablonski con las diferentes transiciones entre estados electrónicos de una molécula.

Cuando el fluoróforo absorbe luz, uno de sus electrones pasa a un estado excitado (de mayor energía) que es inestable, y al retornar a su estado fundamental, el exceso de energía se libera en forma de luz pero de una longitud de onda mayor (menor energía) a la de excitación. Este proceso está representado por el diagrama de Jablonski (Fig. 31). La absorción de la luz de excitación eleva la molécula del fluoróforo a un estado excitado de mayor energía,  $S_2$ . En este estado de excitación se mantienen un tiempo determinado, en el cual la molécula sufre cambios conformacionales e interacciona con las moléculas de su entorno. Como consecuencia, parte de la energía del estado  $S_2$  se disipa, creándose un estado  $S_1$  de menor energía. Pasado este tiempo de excitación la molécula emite luz de menor energía volviendo a su estado fundamental,  $S_0$ .

La fotoluminiscencia es una técnica que permite medir la intensidad de la luz emitida por una muestra para cada longitud de onda  $I(\lambda)$  cuando la muestra es excitada con luz de

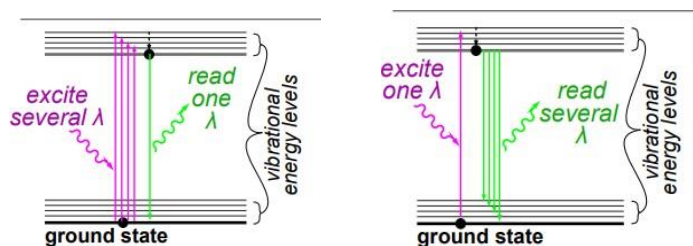
longitud de onda fija  $\lambda_{exc}$ . El espectro de excitación, sin embargo, consiste en observar la intensidad de la emisión  $I(\lambda_{em})$  en una longitud de onda fija  $\lambda_{em}$  mientras se modifica la longitud de onda de la radiación incidente sobre la muestra.

Debido a la diferente configuración electrónica de los fluoróforos cada uno presenta un espectro de excitación y de emisión característico y único. Como información se da el máximo del pico de excitación y el máximo del pico de emisión o bien los espectros de excitación y emisión, que son característicos de cada material y permiten la identificación de componentes en la muestra, así como información de su estructura dentro del material. Dichos espectros se obtienen con un fluorímetro, en el que la presencia de dos monocromadores permite su registro (Fig. 32).



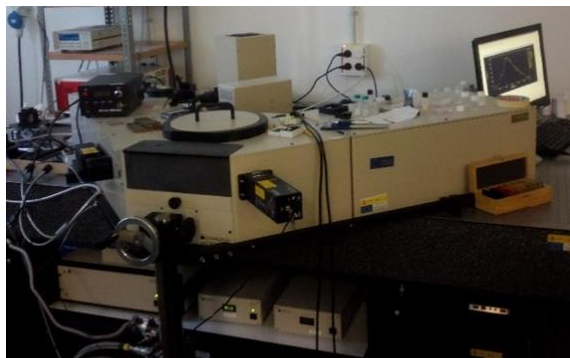
**Figura 32.** Esquema del funcionamiento general de un fluorímetro.

El fluorímetro empleado tiene dos dobles monocromadores: uno de excitación (que permite seleccionar la  $\lambda$  de excitación), y otro de emisión (que permite seleccionar la  $\lambda$  de luminiscencia). El espectro de excitación, se obtiene manteniendo fija la  $\lambda$  de luminiscencia y variando la  $\lambda$  de excitación. Este espectro permite encontrar la  $\lambda$  de excitación que da lugar a la máxima intensidad de fluorescencia. Una vez encontrada esa  $\lambda$ , se selecciona y fija en el monocromador de excitación, y se va variando la  $\lambda$  del monocromador de emisión, con lo que se obtendrá el espectro de emisión (o luminiscencia).



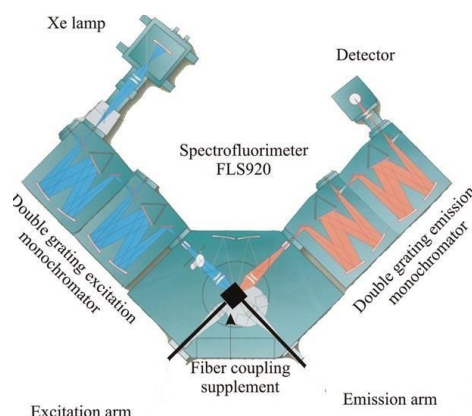
**Figura 33.** a) Transiciones producidas en los espectros de excitación y b) de emisión.

Las experiencias de fotoluminiscencia se realizaron con el fluorímetro Edinburgh Instruments FLS920 (Fig. 34).



**Figura 34:** Fluorímetro Edinburgh Inst. FLS920.

La Fig. 35 muestra el esquema del fluorímetro Edinburgh Inst. FLS920. Consta de dos dobles monocromadores, una lámpara de Xenón continua de 450 W, otra pulsada de 60 W y varios diodos láser. Recientemente, se ha acoplado una fuente de luz supercontinua de MHz.



**Figura 35:** Esquema del funcionamiento del fluorímetro Edinburgh Instrument FLS920

La luz procedente de las fuentes antes mencionadas pasa a través de un doble monocromador (excepto en el caso de los láseres) e incide sobre la muestra (Fig. 36). La luz emitida pasa por un doble monocromador y llega a uno de los tres detectores: un fotomultiplicador centrado en 500 nm, otro fotomultiplicador centrado en 750 nm y un InGaAs para el infrarrojo. Cada detector tiene asociado un juego de redes de difracción distintas, que está situada en la torreta de cada monocromador. (Villanueva, 2012).



**Figura 36.** Compartimento de muestras y portacubetas.



### ***Tiempos de vida luminiscentes***

El tiempo de vida luminiscente ( $\tau$ ), es un parámetro espectroscópico cuyo inverso da información de la probabilidad de transición electrónica por unidad de tiempo de desexcitación de un determinado estado electrónico excitado. En el caso de que  $1/\tau$  sea directamente proporcional a la fuerza de oscilador de la transición ( $\tau^{-1} \propto f_{osc}$ ), la transición es puramente radiativa (Rodríguez, Menéndez, Aguado, Valiente & Recio, 2011). Para el caso de centros luminiscentes asociados a impurezas aisladas, como ocurre en los sistemas impurificados en los que la excitación y emisión tienen lugar en el mismo centro luminiscente, la variación de la intensidad con el tiempo presenta un comportamiento exponencial de la forma:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad (10)$$

Representando la evolución temporal de la intensidad de la luminiscencia tras el cese de la excitación y analizando la curva obtenida  $I(t)$  se puede determinar el tiempo (o tiempos) de vida característico. Su estudio proporciona información sobre los diferentes procesos de desexcitación tanto radiativos como no radiativos y la dinámica asociada a los estados excitados (L. E. Bausá *et al.*, 2005). La evolución de la intensidad de emisión en función del tiempo  $I_e(t)$  nos permite obtener información sobre el origen de la luminiscencia y discernir el origen de dos emisiones coincidentes en longitud de onda pero con tiempos de vida distintos.

Mediante la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC) se adquieren curvas de decaimiento de fluorescencia realizando un histograma de los tiempos de llegada de fotones individuales después de cada pulso de luz. Esta técnica se ha usado en el mencionado espectrofotómetro de fluorescencia en tiempo resuelto, FLS920 (Lakowicz, 1999).

#### **2.2.2. pHmetro Sension+ PH3.**

Es un medidor de laboratorio con electrodo de alto rendimiento. Incluye un sistema de agitación magnética, portasensores, soluciones (pH 4, pH 7, pH 9 y KCl) y matraces de calibración con barra magnética de agitación. Es un equipo que proporciona una gran precisión en la medida del pH de disoluciones.



**Figura 37.** pHmetro Sension+ PH3 usado para nuestro trabajo y situado en el Grupo de Nanomedicina, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria (IDIVAL)

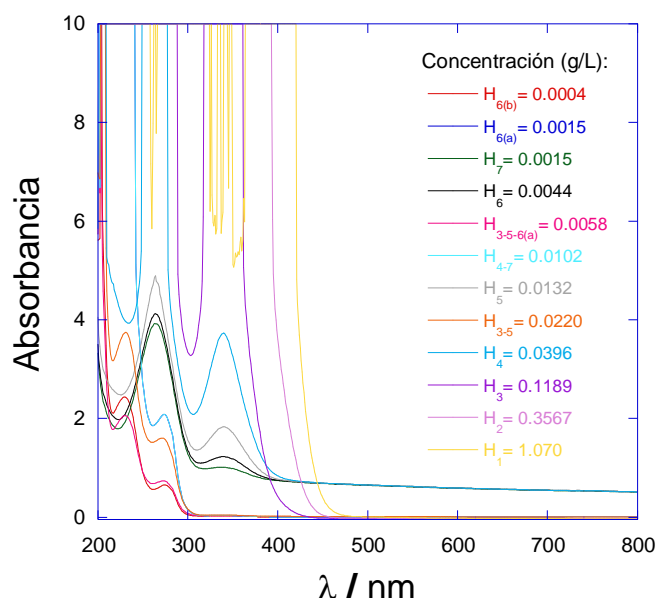
### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Hoechst 33258

##### 3.1.1. Absorción Óptica

En la Fig. 38 se muestran los espectros de absorción de las disoluciones de Hoechst 33258 (apartado 2). Medimos la absorbancia para cada una de las disoluciones  $H_i$ .

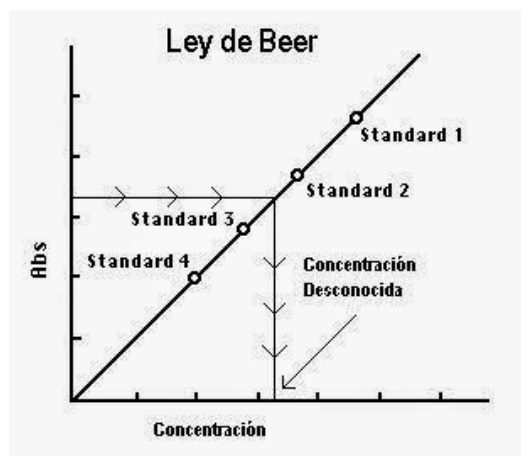
A partir de los espectros de absorción para las distintas concentraciones de Hoechst 33258 (Ver Tabla 4), realizamos una curva de calibrado. Escogemos una longitud de onda para cada espectro, y anotamos el valor de su absorbancia correspondiente. Para hacer las determinaciones cuantitativas se elige, en general, la longitud de onda correspondiente a un máximo, pues el error de medición es menor y la sensibilidad máxima. Una vez que esto se ha realizado se puede hacer la curva de calibración, que nos permita saber la absorbancia de una concentración problema, sin más que ir a dicha recta.



**Figura 38:** Espectros de absorción óptica de las muestras de Hoechst 33258.

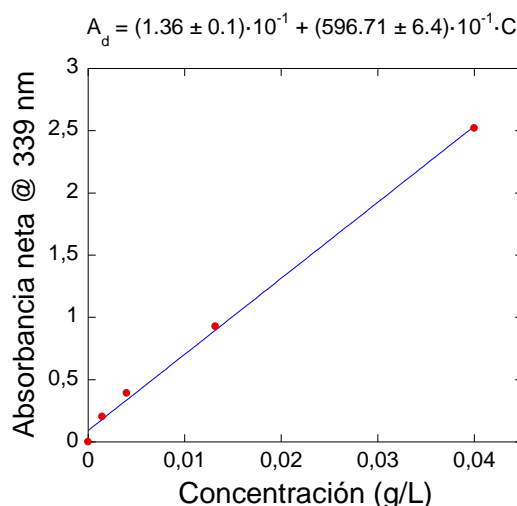
Cuando la disolución estaba muy concentrada, caso de  $H_1$ ,  $H_2$  y  $H_3$ , la muestra satura. Los espectros de absorción de  $H_{4-7}$ ,  $H_7$ ,  $H_6$  y  $H_5$  dan lugar a la aparición de una banda de absorción muy ancha entre 310-430 nm. En el espectro de la solución se observan dos bandas de absorción en torno a los 230 y 273 nm, respectivamente.

La ley de Lambert-Beer permite obtener una relación entre la concentración y la absorbancia (Fig. 39). El proceso de la calibración se basa en medir la absorbancia de varias disoluciones patrón (Fig. 38). De este modo una vez medida la absorbancia de una disolución problema se podría obtener la concentración.



**Figura 39.** Manera de obtener la concentración desconocida a partir de la recta de calibrado.

Para elaborar la recta patrón que relacionara absorbancia con concentración, se tomó la disolución inicial y se diluyó de manera sucesiva en agua destilada, tal como se indicó en la Tabla 3. El volumen final fue el mismo en todos los casos.



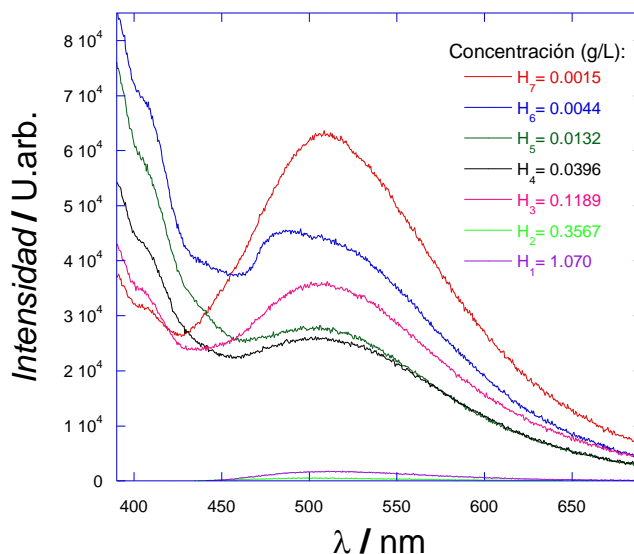
**Figura 40.** Recta de calibrado de Hoechst 33258.

Se puede comprobar mediante la Fig. 40 la linealidad de la Ley de Beer hasta concentraciones de 0.04 g/L. Como se dijo anteriormente, en los casos de H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub>, la muestra satura por ser la disolución es muy concentrada, de modo que no entran dentro de nuestra recta de calibrado.

### 3.1.2. Espectros de Luminiscencia y Excitación

Los espectros de emisión o fluorescencia se han medido excitando a 356 nm y registrando en el rango de 390-690 nm. Medimos a pH neutro (pH= 7). En la Fig. 41 se muestran los espectros de emisión de siete alícuotas de Hoechst 33258.

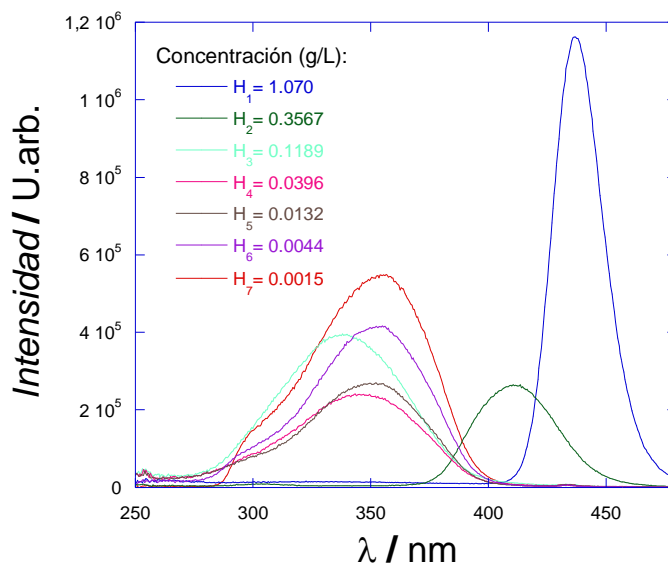




**Figura 41.** Comparativa de los espectros de emisión de fluorescencia superpuestos del Hoechst 33258, a las distintas concentraciones estudiadas, medidos a  $\lambda_{exc}$  de 356 nm y con una resolución 0,5 nm.

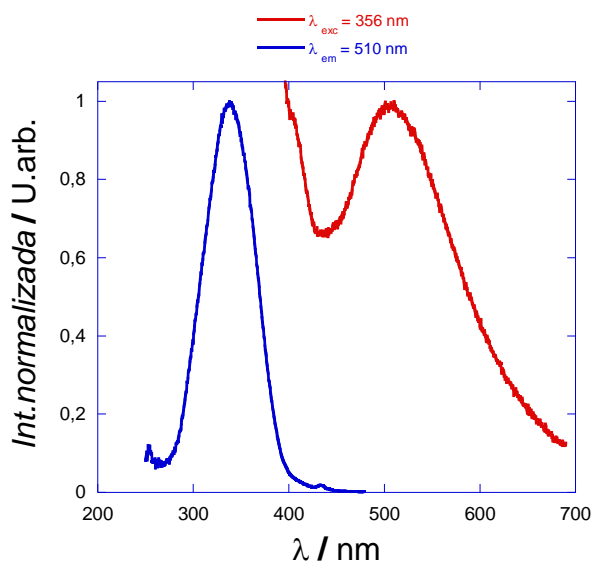
Las disoluciones acuosas de Hoechst 33258 exhibían aproximadamente una fluorescencia a  $\lambda_{em} = 510$  nm y después de la iluminación no se produce un desplazamiento notable en posición de la emisión.

Los espectros de excitación se han obtenido midiendo la luz emitida a 510 nm. De la misma forma que en emisión, medimos a pH neutro a distintas concentraciones.



**Figura 42.** Espectros de excitación de las diferentes concentraciones de Hoechst 33258 emitiendo a 510 nm.

En la Fig. 42, se muestran los espectros de excitación del Hoechst 33258 que consisten en bandas cuya posición depende de la concentración. Pasando de 437 nm a aproximadamente 350 nm al disminuir la concentración de 1.07 a 0.04 g/L.



**Figura 43.** Perfil y variación de los espectros normalizados de emisión (rojo) y excitación (azul) de Hoechst 33258 en solución acuosa.

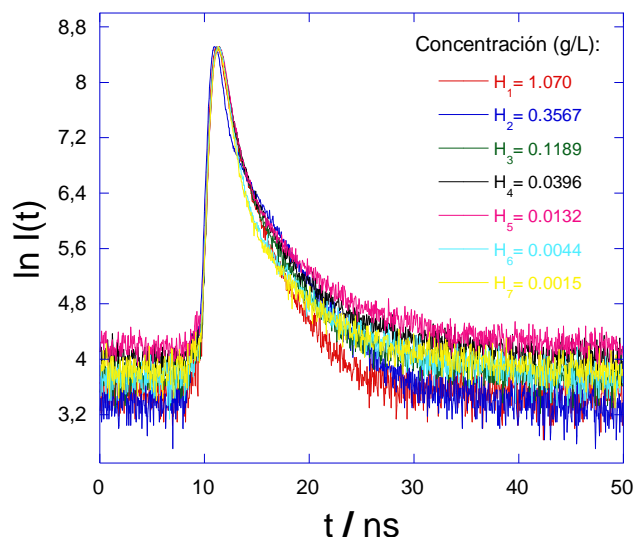
En la Fig. 43 podemos observar como el espectro de emisión está desplazado respecto al de absorción, a este fenómeno se le denomina desplazamiento de Stokes (*Lakowicz, 2006*).

Analizando los resultados, se obtiene para la línea azul, que representa el espectro de excitación, un máximo en 338 nm (en el UV cercano) y para la línea roja, que representa el espectro de emisión, un máximo en 501 nm (en la región del azul). Se comparan de manera satisfactoria los espectros anteriores con los espectros que se encuentran en la bibliografía para el Hoechst 33258, también para pH = 7 (*Latt, S.A., y Stetten, G., 1976*) (*Applied Sensor Group of the Institute of Analytical Chemistry at the Graz University of Technology in Austria, 2012*).

### 3.1.3. Tiempos de Vida

El tiempo de vida de fluorescencia ( $\tau_F$ ) de una sustancia representa el tiempo promedio en el que, una población de moléculas excitadas disminuye a 1/e su valor inicial (*Lakowicz, 1999*). Para su estudio se mide la intensidad de luz emitida en función del tiempo tras el cese de la excitación. La variación de la intensidad de la luz emitida en función del tiempo se ha registrado mediante la técnica TCSPC (Tiem correlating single photon counting) mientras la muestra era excitada con láser pulsado de 405 nm de picosegundos.

En la Fig. 44 se muestran la evolución temporal de la luminiscencia del Hoechst 33258 para distintas concentraciones.



**Figura 44.** Decaimiento de la luminiscencia tras excitación pulsada con un láser de diodo.

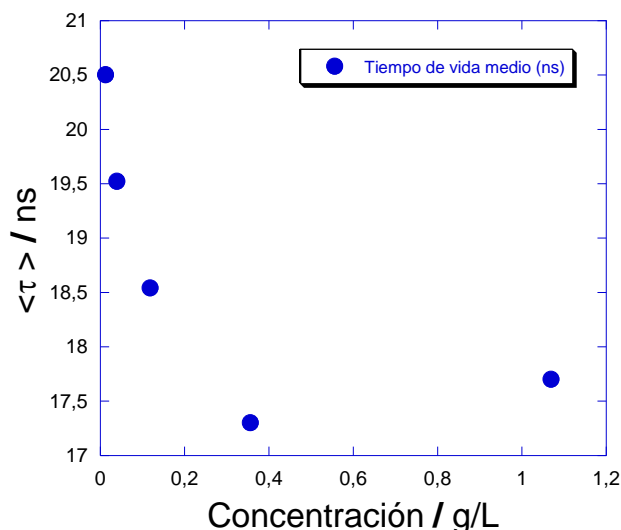
Se puede apreciar en la Fig. 44 que el decaimiento no es exponencial. Este fenómeno suele ocurrir cuando la concentración aumenta, ya que se pierde el carácter exponencial. En ese caso, lo que se determina es el tiempo de vida promedio (Tabla 8):

$$\langle \tau \rangle = \frac{\int_{T_0}^T t \cdot I(t) dt}{\int_{T_0}^T I(t) dt} \quad (11)$$

**Tabla 8.** Diferentes muestras de colorante Hoechst, con sus respectivas concentraciones en g/L y el tiempo de vida medio obtenido para cada una de ellas.

MUESTRA HOECHST	CONCENTRACIÓN (g/L)	TIEMPO DE VIDA (ns)
H <sub>1</sub>	1.070	17.7
H <sub>2</sub>	0.3567	17.3
H <sub>3</sub>	0.1189	18.54
H <sub>4</sub>	0.040	19.52
H <sub>3-5</sub>	0.020	~
H <sub>5</sub>	0.0132	20.5
H <sub>4-7</sub>	0.010	~
H <sub>3-5-6'</sub>	0.0050	~
H <sub>6</sub>	0.0040	19.03
H <sub>7</sub>	0.00146	19.39
H <sub>6'</sub>	0.00146	~
H <sub>6''</sub>	0.0003	~

La Fig. 45 recoge la variación del tiempo de vida con la concentración.



**Figura 45.** Variación del tiempo de vida medio en función de la concentración para el Hoechst 33258.

### 3.1.4. Influencia del pH en el Hoechst 33258

Se ha obviado el uso del Hoechst 33258 como indicador de pH, debido a que, al encontrarnos con estudios previos (*Żurek-Biesiada, D. & Waligórski, P. & Dobrucki J.W., 2014*), la conclusión es que la absorción apenas cambia y la emisión lo hace entre pH 7.4 y 11.5. Como para estudios biológicos lo ideal es entre 4.5-5 y 9-9.5, no se hace necesario ese estudio. El pH en este caso, no es sensible a la posición de la banda y que haya una variación en la intensidad no es relevante desde el punto de vista de este trabajo. Con esa variación podemos deducir que el Hoechst 33258 es buen indicador químico y no tan bueno biológico.

## 3.2. Naranja de Acridina

### 3.2.1. Absorción Óptica

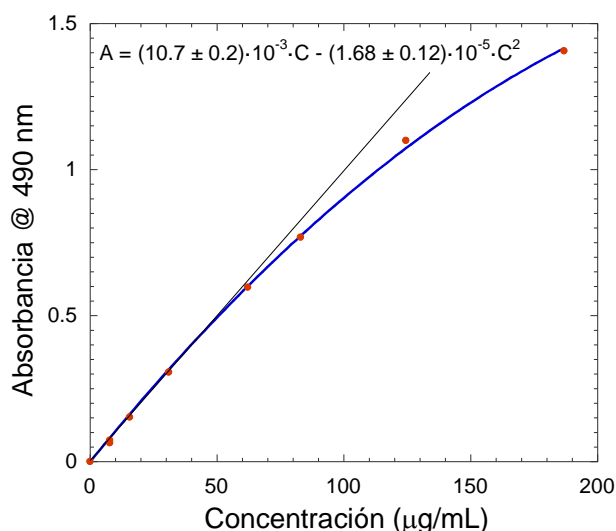
Como se hizo para el Hoechst 33258, la obtención de una curva de calibración implica la preparación de diferentes disoluciones patrón de la muestra a estudiar a partir de una disolución concentrada (ver Tabla 6), cuyas bandas de absorción se encuentran comprendidas, por lo general, en la región UV-vis del espectro (200-800 nm).

Una vez determinado el valor de longitud de onda al que el compuesto presenta el máximo de absorbancia ( $\lambda_{\text{máx}} = 490 \text{ nm}$ ), se mide ésta a dicha  $\lambda_{\text{máx}}$  para cada disolución de la muestra a caracterizar, obteniéndose así la recta de calibrado del sistema.

El uso de las curvas de calibración en el análisis químico es muy importante, ya que esta recta permitirá la determinación cuantitativa de una muestra de concentración desconocida de dicho compuesto, sin más que medir su absorbancia y sustituir en la ecuación de la recta/curva de calibración (Fig. 46).

**Tabla 9.** Diferentes disoluciones de colorante naranja de acridina y su valor de absorbancia para la longitud de onda máxima del espectro.

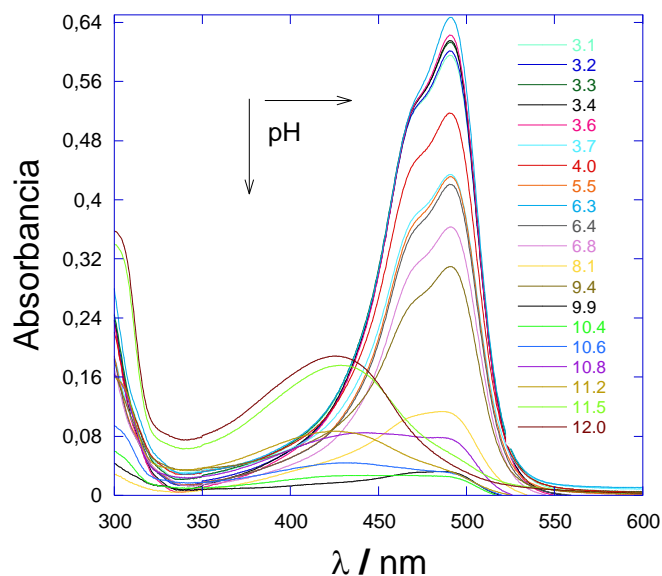
MUESTRA NARANJA DE ACRIDINA	ABSORBANCIA MÁXIMA @ 490 nm
NA <sub>1</sub>	1.41
NA <sub>2</sub>	1.10
NA <sub>3</sub>	0.77
NA <sub>4</sub>	0.60
NA <sub>5</sub>	0.31
NA <sub>6</sub>	0.15
NA <sub>7</sub>	0.07

**Figura 46.** Curva de absorbancia frente a la concentración para soluciones de naranja de acridina, junto con la curva de calibración.

En la Fig. 46 se observa que para concentraciones superiores a 50 µg/mL deja de tener validez la ley de Lambert-Beer aunque la ecuación de calibración permite obtener la concentración de una disolución problema.

Para evaluar cómo afecta a las propiedades ópticas del naranja de acridina el cambio en el pH, se preparó una disolución compuesta de HCl al 37% y agua destilada, concentrada 1/26 (una parte de HCl y 25 partes de agua) para acidificar las muestras y en sentido opuesto, se basifica el pH de la disolución mediante NaOH concentrado 1N. El pH se ajusta sucesivamente, añadiendo gota a gota volumen ácido o básico a nuestra disolución en el rango de los microlitros (µL) a la disolución de naranja de acridina de partida. Las disoluciones obtenidas toman un color anaranjado, debido a sus diferentes valores de pH. Se observa que los pH ácidos presentan mucha mayor absorbancia a longitudes de onda mayores.

En la Fig. 47 se muestran los espectros de absorción óptica de las disoluciones de acridina naranja para distintos valores del pH, medidos a temperatura ambiente.



**Figura 47.** Espectros de absorción molecular de una disolución acuosa de naranja de acridina (1/5) a distintos valores de pH.

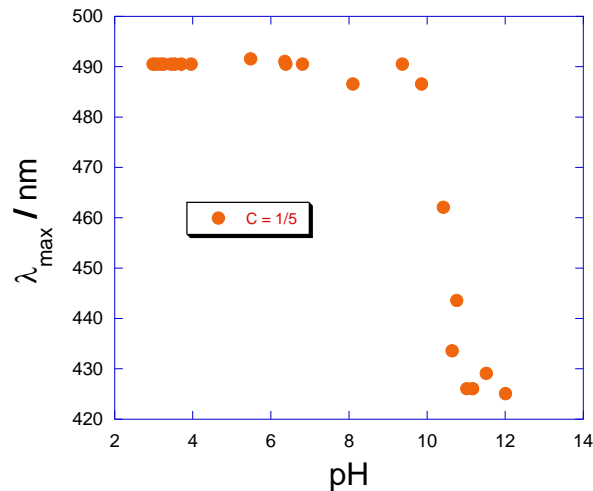
Se observa un claro desplazamiento de las bandas de absorción hacia menores longitudes de onda al disminuir el valor del pH, pasando de 490.5 nm a pH = 3.6 a máximos de absorción en 426 nm a pH = 11.2. El naranja de acridina es, según la bibliografía usada en el apartado 2), un indicador de pH de color naranja a pH 8.4 (*Boca Ratón, 1993*).



**Figura 48.** Muestras de naranja de acridina en función del pH obtenidas en el laboratorio.

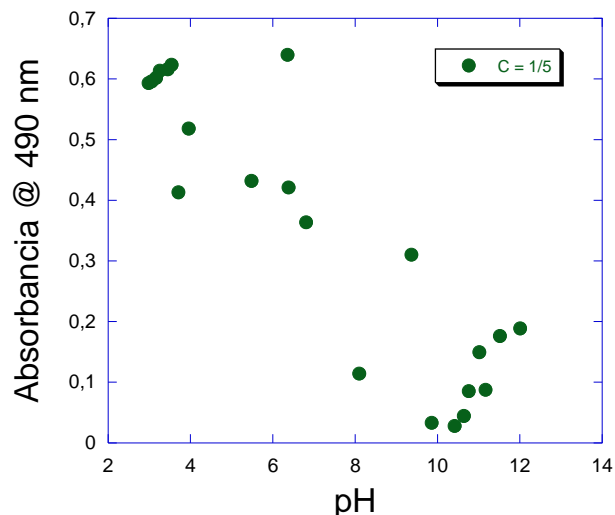
A partir de los espectros de absorción de la (Fig. 47) se puede determinar cómo cambia el máximo de absorción con el pH.

En la Fig. 49, se muestran valores del pH para los que apenas se observan cambios en la longitud de onda, aunque si lo hace la intensidad de la banda. Sin embargo, dicha variación es evidente para valores del pH entre 9.5 y 11. Se prepararon muestras con pH entre esos valores y se comprobó que es gradual, es decir, no hay un salto. Contrariamente, no se aprecia variación en el intervalo de pH 3.1-9.5 y en el de pH 11-12, indicando que no se trataría de un buen sensor óptico para el caso de la absorción. Por lo demás, no parece un sistema muy interesante desde el punto de vista biológico, aunque si pudiera serlo en química como marcador.



**Figura 49.** Variación de la longitud de onda del máximo de absorción para el naranja de acridina para la concentración 1/5 (12  $\mu\text{g/mL}$ ), en función del pH.

Si estudiamos cómo influye el pH en la absorbancia de las muestras del experimento anterior observamos que el máximo de absorbancia frente al pH muestra una variación sensible en la mayor parte del rango (Fig. 50).



**Figura 50.** Representación del producto de la longitud de onda máxima por su absorbancia correspondiente en función del pH, para las diferentes concentraciones de naranja de acridina.

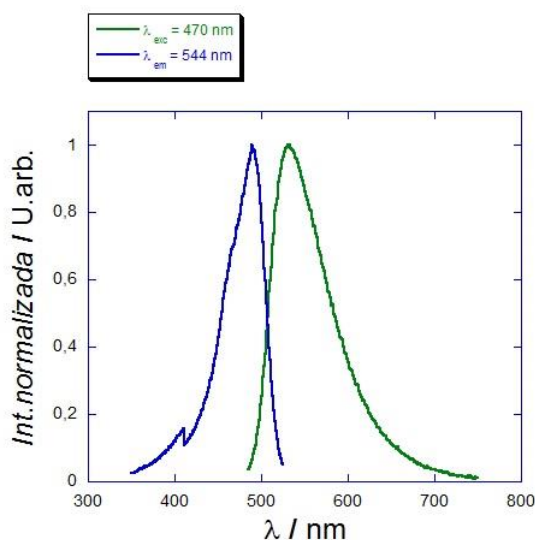
Se puede observar como hay una disminución de la absorción desde los valores más ácidos a los más básicos para la absorbancia a 490 nm. Las zonas de mayor pendiente, en la Fig. 50 son en las que el sensor presenta la mayor sensibilidad, es decir para valores de pH entre 4 y 10.



**Figura 51.** Muestras de naranja de acridina elaboradas, en donde visualmente se verifica el viraje que sufre en función del pH.

### 3.2.2. Espectros de Luminiscencia y Excitación

Se ha medido la fluorescencia de disoluciones acuosas de naranja de acridina para distintas concentraciones.



**Figura 52.** Espectros de excitación y emisión realizados detectando a  $\lambda_{em} = 544$  nm y excitando con  $\lambda_{exc} = 470$  nm respectivamente.

En la Fig. 52 se muestran los espectros de excitación y emisión de una disolución de naranja de acridina ( $NA_6$ ) obtenidos para una longitud de onda de emisión de  $\lambda_{em} = 544$  nm y una longitud de onda de excitación de  $\lambda_{exc} = 470$  nm, respectivamente. Ambos espectros se normalizaron al pico más intenso para así poder compararlos.

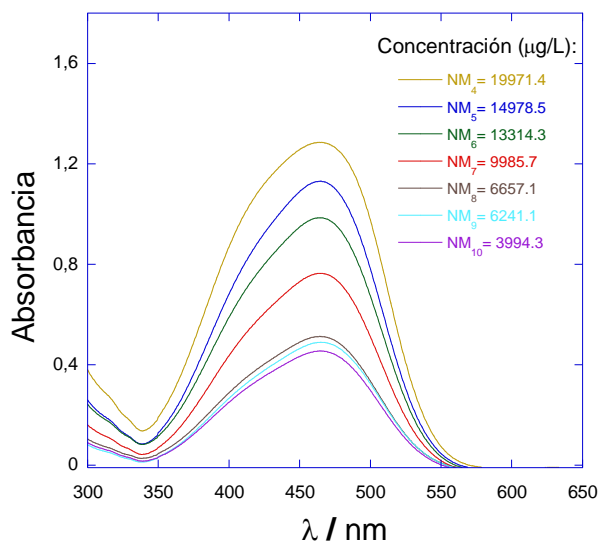
## 3.3. Naranja de Metilo

### 3.3.1. Absorción Óptica

Los espectros de absorción se han registrado en un espectrofotómetro de doble haz Cary 6000i en el rango entre 650 nm y 300 nm para disoluciones de diferente concentración ( $NM_i$ ). A partir de los espectros de absorción y la concentración se obtuvo la curva de



calibrado. Se ha tomado la posición del máximo de absorción (464 nm) (*Hussein Hadi & Hilal S. Wahab, 2015*). Los espectros de absorción del naranja de metilo a diferentes concentraciones muestran dos bandas de absorción con máximos en torno a 271 nm y 464 nm (Fig. 53).



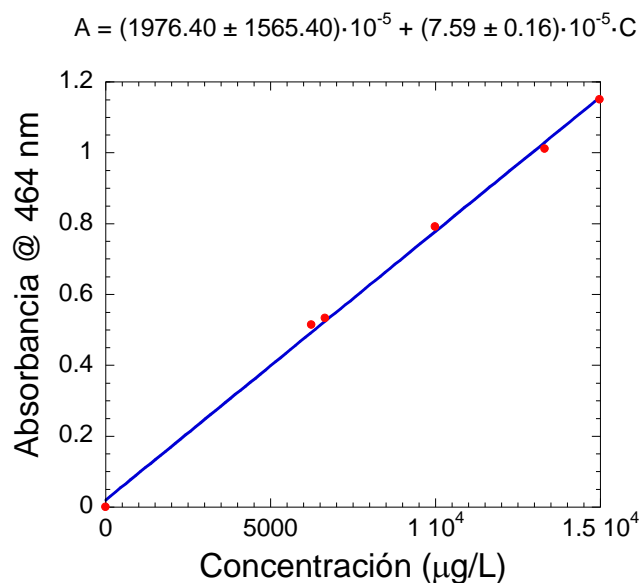
**Figura 53.** Espectros de absorción óptica de las muestras de naranja de metilo.

En la Tabla 10 se resume las características de las distintas disoluciones empleadas así como su denominación a lo largo de todo el trabajo.

**Tabla 10.** Diferentes disoluciones de colorante naranja de metilo y su valor de absorbancia para la longitud de onda máxima del espectro.

MUESTRA NARANJA DE METILO	ABSORBANCIA MÁXIMA @ 464 nm
NM <sub>1</sub>	1.21
NM <sub>2</sub>	1.48
NM <sub>3</sub>	1.49
NM <sub>4</sub>	1.29
NM <sub>5</sub>	1.01
NM <sub>6</sub>	0.79
NM <sub>7</sub>	0.48
NM <sub>8</sub>	0.53
NM <sub>9</sub>	0.51
NM <sub>10</sub>	1.15

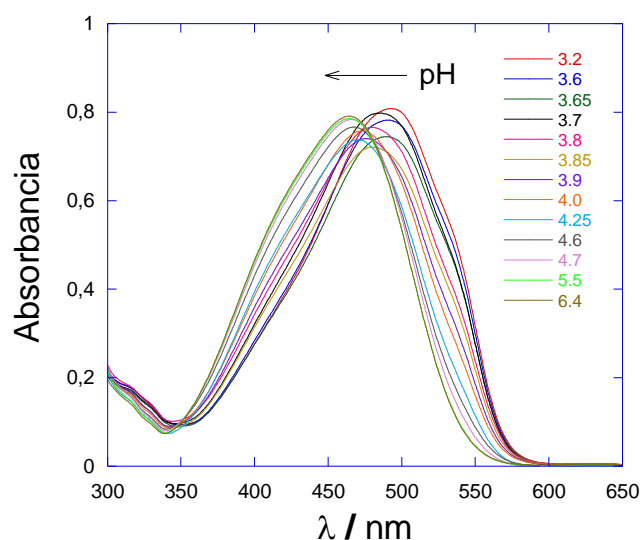
La Fig. 54 muestra la recta de calibración de las disoluciones de naranja de metilo obtenido a partir de la absorbancia en el máximo (464 nm), que se corresponde con la máxima sensibilidad. Los pares de valores concentración-absorbancia se ajustan a una recta, a partir de la cual pueden obtenerse la concentración del analito en muestras desconocidas. De este modo para determinar la concentración de una muestra problema sólo tenemos que hallar la absorbancia de la disolución problema y extrapolarla en la curva de calibrado. Esta técnica sólo es válida si la muestra cumple la ley de Lambert-Beer. Se puede corroborar que la linealidad de la Ley de Beer se verifica hasta concentraciones cercanas a 15000 µg/mL.



**Figura 54.** Curva de absorción frente a la concentración para soluciones de naranja de metilo.

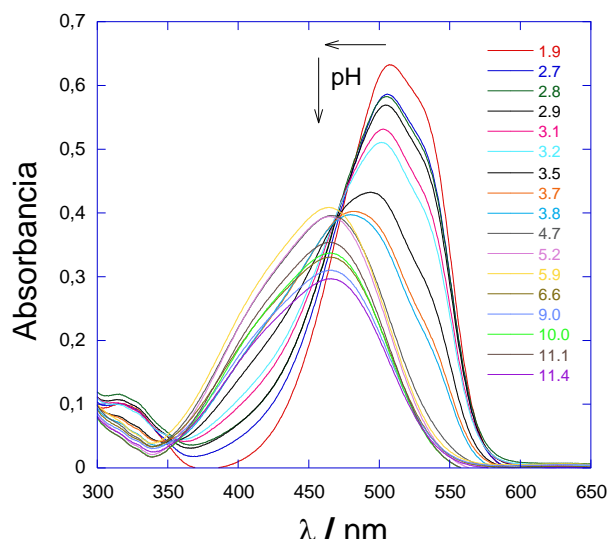
A continuación se trató de estudiar el efecto del pH en los espectros de absorción. Los espectros de absorción de las formas ácido-base fueron obtenidos de diferentes alícuotas de una misma solución a valores diferentes de pH. Las disoluciones obtenidas toman colores diversos, según sean ácidas o básicas. Así, por ejemplo, una disolución de pH = 1, muestra un color rojo y una disolución básica (pH = 13) color amarillo. Todas las disoluciones preparadas se guardaron en tubos eppendorf de 1.5 mL.

Posteriormente, se midieron los espectros de absorción para cada pH. En las Fig. 55, Fig. 56 y Fig. 57 se representan gráficamente los valores de absorción frente a la longitud de onda para cada valor de pH y para cada concentración inicial de naranja de metilo.



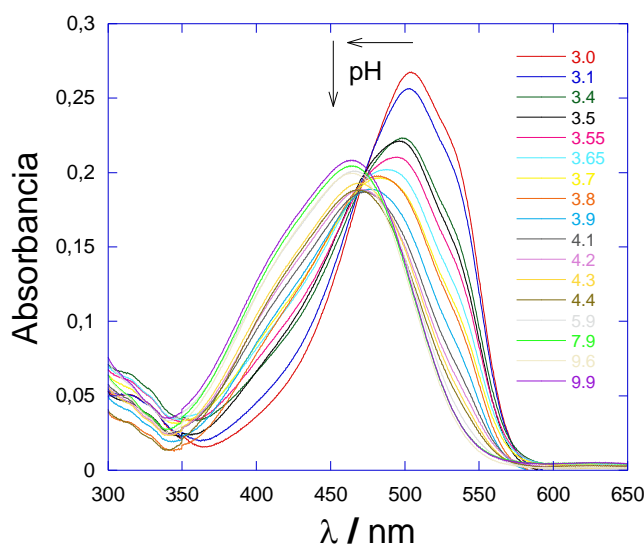
**Figura 55.** Espectros de absorción UV-visible para diferentes valores de pH en la concentración 1/40 de naranja de metilo.

La Fig. 55 muestra los espectros de absorción óptica frente al pH a una concentración 1/40. El máximo de absorción varía desde los 495 nm a los 460 nm, disminuyendo de valores ácidos a más básicos.



**Figura 56.** Espectros de absorción de los sensores sumergidos en soluciones de diferente pH en la concentración 1/80 de naranja de metilo.

En la Fig. 56 la existencia del punto isobéptico alrededor de los 352 nm parece apuntar a la presencia de un equilibrio entre dos especies absorbentes. Es evidente que cuando las especies absorbentes están implicadas en un equilibrio ácido-base, la ley de Beer no se cumple, al menos que el pH o la fuerza iónica sean constantes, o se opere a la longitud de onda del punto isobéptico, esto es, la longitud de onda a la cual las dos especies absorbentes en equilibrio presentan la misma absorbancia. En la Fig. 57 se han representado los espectros de absorción del indicador ácido-base a distintos valores de pH para una concentración 1/160.



**Figura 57.** Espectros de absorción molecular de una disolución acuosa de naranja de metilo (concentración 1/160) a distintos valores de pH.

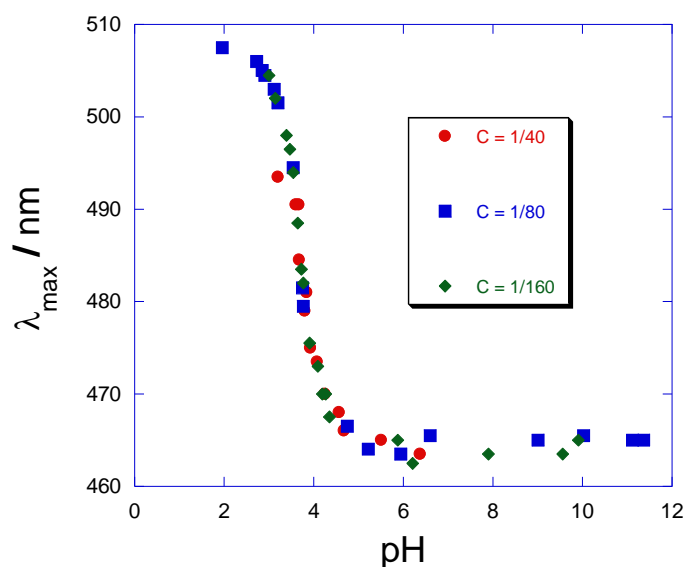
A modo de resumen, si el pH es mayor de 4,4, la disolución presenta un color amarillo - anaranjado, y torna a rojo para valores menores de 3,1 (Fig. 58). A pH 2,5, tiene un máximo de absorbancia en torno a los 500 nm (*Sha, Y. et al., 2015*). (*Sandberg, R.; Henderson, G.; White, R.; Eyring, E., 1972*).

A la vista de los espectros de absorción de la forma ácida y básica del indicador, se apreciará un máximo para la forma básica en torno a 464 nm, justamente el valor de la  $\lambda_{\text{max}}$  del indicador a pH neutro, y un máximo para la forma ácida entre 495-505 nm. Sin embargo, el comportamiento en la zona intermedia de pH es realmente complejo.



**Figura 58.** Muestras de naranja de metilo en función del pH obtenidas en el laboratorio.

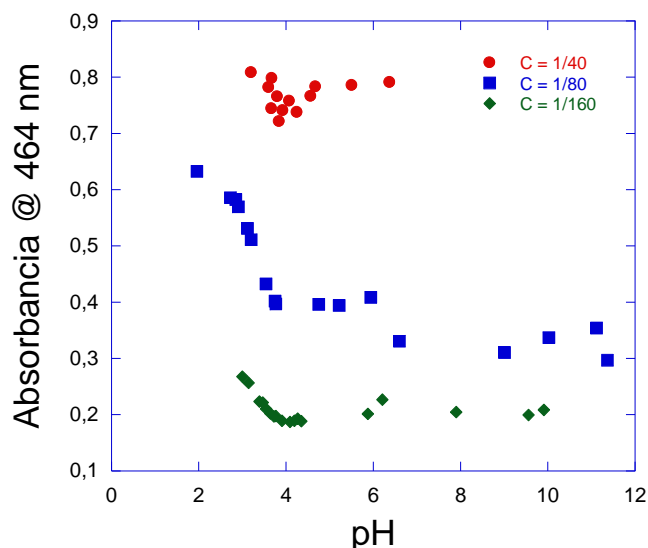
El cambio de color con el pH del naranja de metilo se puede utilizar para determinar el pH. Se determina la posición del máximo de absorción (longitud de onda del máximo) en función del pH y se representa para las tres concentraciones anteriores, como se ve en la Fig. 59.



**Figura 59.** Variación de la longitud de onda del máximo de absorción visible de nuestro sensor a base de naranja de metilo para las concentraciones 1/40, 1/80 y 1/160, en función del pH.

A partir de la Fig. 59 se puede determinar el pH a partir del máximo de la banda de absorción, en especial para valores del pH entre 2 y 6. Demostrando que se trata de un buen sensor óptico en ese rango. Para el caso de los estudios biológicos lo ideal es disponer de un sensor que varíe su pH entre 4.5 y 8.5, de modo que el naranja de metilo se ajusta parcialmente a esa característica. El indicador más adecuado sería aquel que presenta un intervalo de viraje reducido y sufre un cambio de color más nítido dentro de la escala de pH donde se trabaje. Se midieron las absorbancias correspondientes de las

disoluciones preparadas para las tres concentraciones anteriores, a una longitud de onda de 464 nm, que es la zona del máximo de absorción de indicador ( $\lambda_{\text{max}}$ ) a pH neutro. Veremos si se puede ampliar el rango en el pH mediante el parámetro de la absorbancia en los espectros.

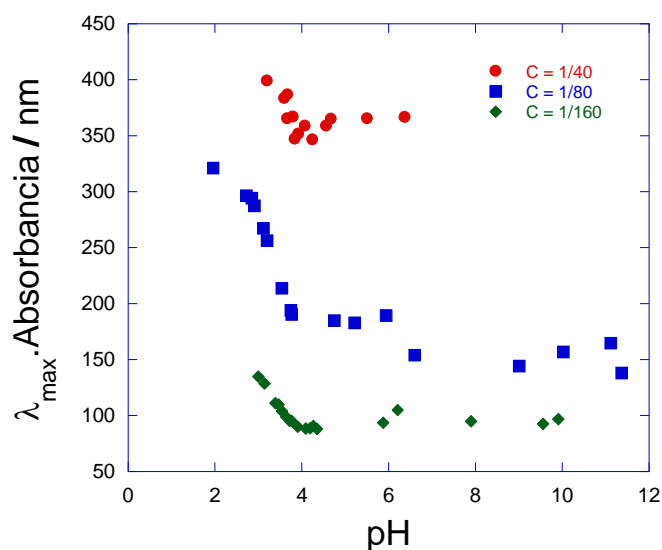


**Figura 60.** Representación de la absorbancia a  $\lambda = 464$  nm frente al pH, para las diferentes concentraciones de naranja de metilo.

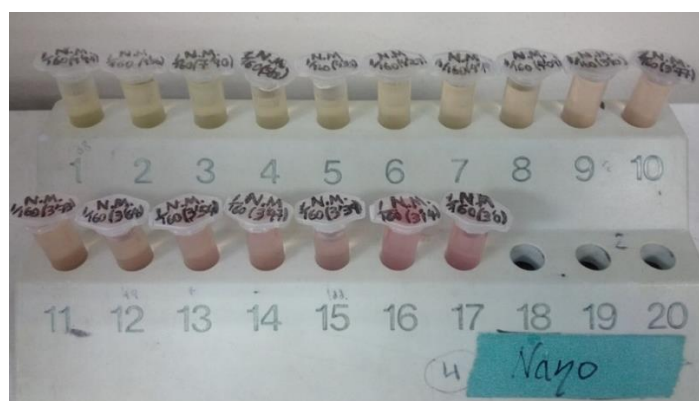
Cuando se representa la absorbancia a una determinada  $\lambda$  frente al pH, se obtiene una curva sigmoidea (*Ronchera-Oms, 2011*). La parte de la izquierda corresponde a la forma ácida, mientras que la parte de la derecha corresponde a la forma básica en éste caso. Se contempla la influencia de la concentración en la forma de cada una de las tres curvas, siendo justamente la intermedia, la de 1/80, la que más cambio en la absorbancia tiene en función del pH para  $\lambda = 464$  nm. Se calculó el producto de las absorbancias de las disoluciones preparadas a una longitud de onda, que sea la de la zona del máximo de absorción de indicador, por esa misma  $\lambda$ . Posteriormente se realiza una representación gráfica en que se manifieste el comportamiento de dicho producto frente al pH (Fig. 61).

Se puede concluir que este sensor es más sensible para que los ácidos que para las bases. Una de las características del sensor, es ser reversible, es decir puede cambiar de color al variar su pH de ácido a básico y a continuación de básico a ácido.

Se puede ver como el producto de ambas magnitudes ofrece valores mayores para concentraciones también mayores, así para la concentración de 1/40 ese producto tiene un valor mayor que para la de 1/80, y a su vez, ésta última lo tiene con respecto a la de 1/160.



**Figura 61.** Representación del producto de la longitud de onda máxima por su absorbancia correspondiente en función del pH, para las diferentes concentraciones de naranja de metilo.



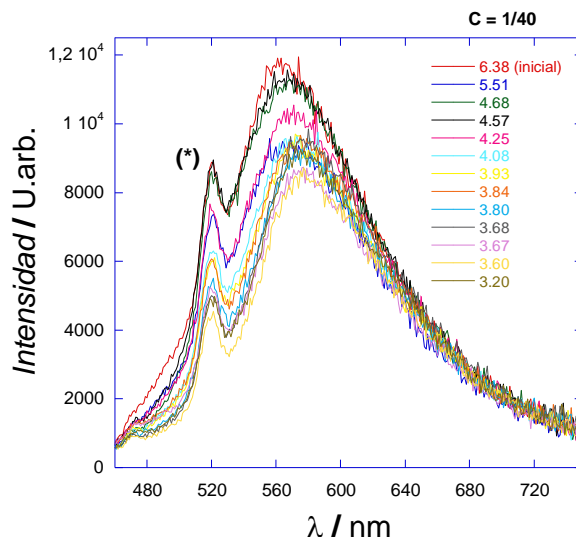
**Figura 62.** El naranja de metilo es un indicador ácido-base muy conocido, resultando naranja en medio básico y rojo en medio ácido, como pudimos comprobar.

La Fig. 62 muestra la variación de color en función del pH. Se corrobora que en una disolución muy ácida, el  $\text{pH} \approx 1$  y presenta coloración roja, mientras que en una disolución muy básica, el  $\text{pH} \approx 13$  y presenta coloración amarilla.

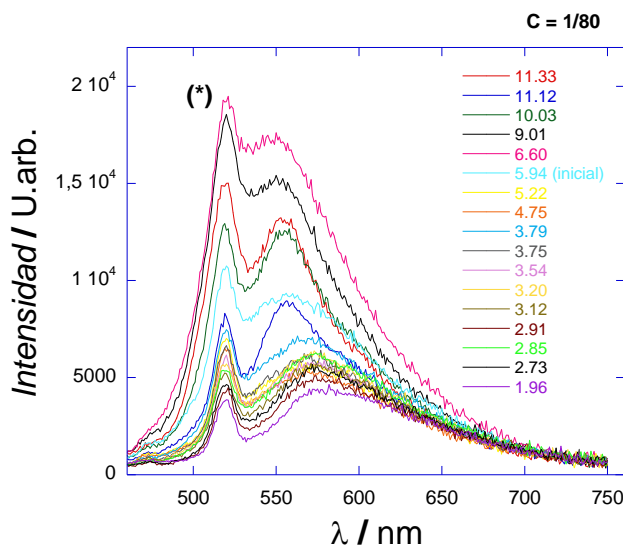
### 3.3.2. Espectros de Luminiscencia

Medimos los espectros de emisión del naranja de metilo en función del pH para las tres concentraciones analizadas previamente. Los procedimientos analíticos basados en la medida de fluorescencia requieren habitualmente un control minucioso del pH. Los espectros de emisión se han obtenido a partir de una longitud de onda de excitación  $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ , registrando la emisión en el rango de 460-750 nm. Como puede observarse en los tres experimentos la posición de la banda principal se desplaza ligeramente hacia menores longitudes de onda y las intensidades de esta banda disminuyen de acuerdo con el pH. Cuando el pH alcanza valores intermedios, ya alcalinos, se observa una inesperada disminución de la intensidad y continúa la inversión de las intensidades a medida que el pH aumenta.



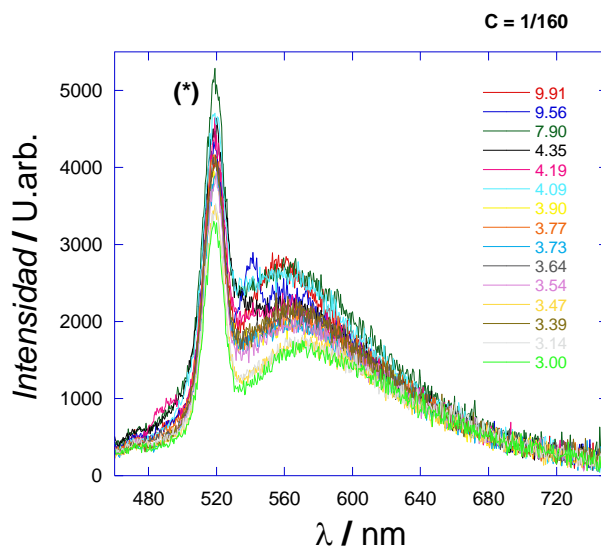


**Figura 63.** Espectros de emisión de fluorescencia del naranja de metilo en función del pH para la concentración preparada de 1/40, medidos a  $\lambda_{exc} = 440$  nm y con una apertura de las rendijas de 5 nm.  
(\*) Pico Raman del agua, aproximadamente a 520 nm.



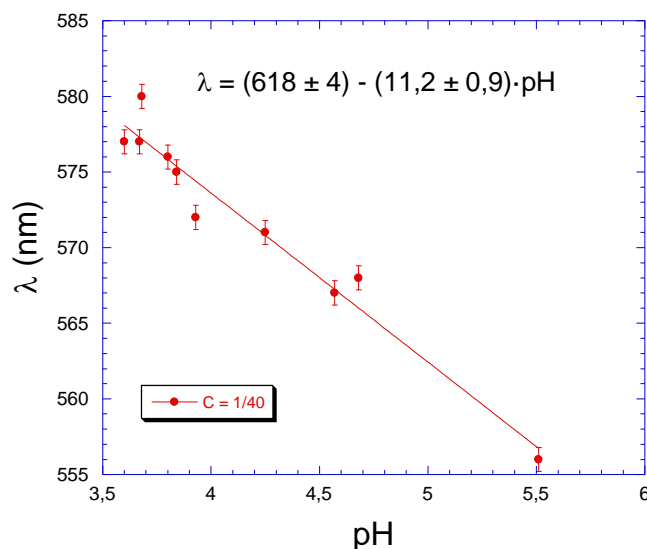
**Figura 64.** Espectros de emisión de fluorescencia del naranja de metilo en función del pH para la concentración preparada de 1/80, medidos a  $\lambda_{exc} = 440$  nm y con una apertura de las rendijas de 5 nm.  
(\*) Pico Raman del agua, aproximadamente a 520 nm.

En las Figs. 63-65 se muestra el comportamiento de un sensor sensible al pH, donde para dos valores de pH distintos, los máximos de emisión cambian, cambiando sus intensidades relativas pero sin sufrir casi desplazamientos en las longitudes de onda. Observando los espectros de emisión del naranja de metilo, observamos un comportamiento distinto al que hemos descrito al analizar sus espectros de absorción: el sensor tiene una variación lineal de su emisión en función del pH, tanto cuando el pH es demasiado bajo o demasiado alto.



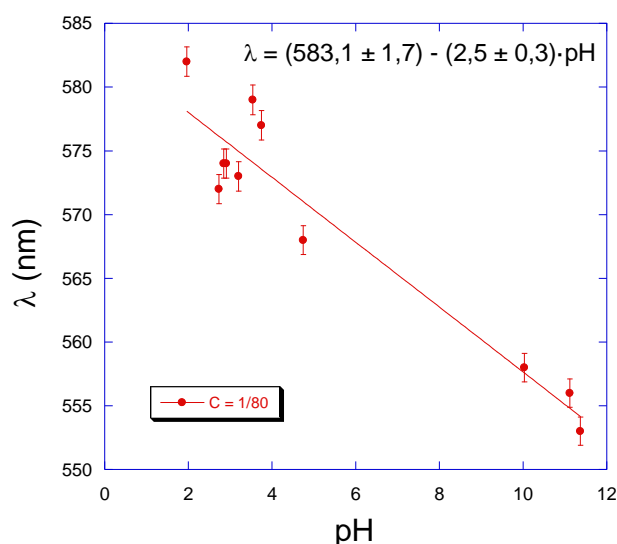
**Figura 65.** Espectros de emisión de fluorescencia del naranja de metilo en función del pH para la concentración preparada de 1/160, medidos a  $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$  y con una apertura de las rendijas de 5 nm. (\*) Pico Raman del agua, aproximadamente a 520 nm.

A partir de las Figs. 63, 64 y 65, se observa que conforme aumenta el pH, aumenta la intensidad de luminiscencia. Se observa un pico correspondiente a la señal Raman del agua, en torno a 510-520 nm. En ciertos materiales, el scattering Raman se ve enmascarado por el fenómeno de fluorescencia (*Sinfield J. V., Colic O., Fagerman D., y Monwuba C., 2010*). Al contrario de lo que ocurre en nuestro caso debido a la baja intensidad de la emisión.

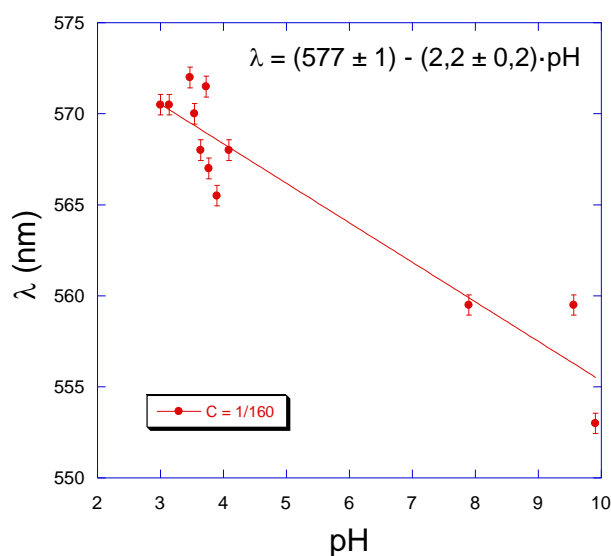


**Figura 66.** Ajuste lineal efectuado para representar la longitud de onda máxima en función del pH del naranja de metilo para la concentración 1/40.

Se concluye que la fluorescencia del compuesto naranja de metilo depende ligeramente del pH. Analizando en detalle la influencia del pH para las tres concentraciones, vemos en la Fig. 66 que la longitud de onda máxima disminuye con el aumento del pH para la concentración 1/40, de igual modo para 1/80 y 1/160 (Figs. 67 y 68).



**Figura 67.** Ajuste lineal efectuado para representar la longitud de onda máxima en función del pH del naranja de metilo para la concentración 1/80.



**Figura 68.** Ajuste lineal efectuado para representar la longitud de onda máxima en función del pH del naranja de metilo para la concentración 1/160.

### 3.3.3. Tiempos de Vida

Finalmente estudiamos la variación del tiempo de vida de la emisión de naranja de metilo con el pH. El tiempo de vida se ha obtenido mediante la deconvolución de la señal de pulso de las curvas de desactivación. El comportamiento no se corresponde con una exponencial sencilla. Las curvas de desactivación se ajustan a la ecuación:

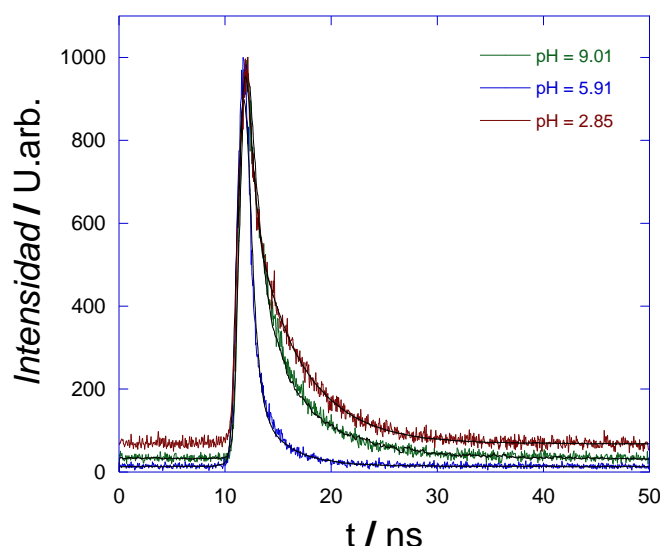
$$I(t) = \sum B_i e^{-t/\tau_i} \quad (12)$$

Donde  $B_i$  son los factores pre-exponenciales relacionados con el peso estadístico de cada exponencial. La fiabilidad del proceso de deconvolución viene controlado por  $\chi^2$ , que debe ser menor de 1,2 y por la distribución de residuos. (López Arbeloa, F.; Bañuelos, J.; Martínez, V.; Arbeloa, T.; López Arbeloa, I., 2005)

La variación de la intensidad de emisión con el tiempo, después del pulso, se ha ajustado a una función biexponencial para cada una de las muestras, cada una con su contribución. En estos casos, el valor que se escoge para el tiempo de vida es el obtenido mediante la media ponderada:

$$\tilde{\tau} = \frac{\tau_1 B_1 + \tau_2 B_2}{B_1 + B_2} \quad (13)$$

En la Fig. 69 se puede observar el decaimiento de la fluorescencia para el naranja de metilo en la concentración 1/80.



**Figura 69.** Variación temporal de la emisión del naranja de metilo para la concentración 1/80, en función del pH, junto con su ajuste por mínimos cuadrados.

En la tabla 11 se muestran los resultados de los decaimientos. Se observan para cada pH, los tiempos de vida y factores preexponenciales calculados para el ajuste biexponencial de decaimiento para el naranja de metilo. También se da la media ponderada del tiempo de vida con el peso de las dos exponenciales.

**Tabla 11.** Valores de los parámetros para los ajustes exponenciales de los decaimientos.

pH	$\tau_1$ (ns)	$B_1$ (A)	$\tau_2$ (ns)	$B_2$ (A)	$\tilde{\tau}$ (ns)
2.85	0.51	0.057	4.53	0.025	1.74
5.91	0.53	0.096	3.30	0.006	0.69
9.01	0.10	0.302	0.49	0.052	0.16

Se puede concluir que tanto la intensidad de fluorescencia en estado estacionario, como el tiempo de vida de fluorescencia, son sensibles al valor de pH de la disolución. Los resultados obtenidos muestran la capacidad del naranja de metilo como sensor fluorescente.

## 4. Conclusiones

En este trabajo se ha obtenido el análisis de las propiedades ópticas de tres colorantes, con el fin de estudiar y analizar sus posibles usos como sensor óptico en la medida del pH. Se trata, en esencia, de usar a los cromóforos con el objeto de ser medidores de pH. El estudio de las muestras preparadas mediante diferentes técnicas nos ha llevado a las siguientes conclusiones:

- Se ha resuelto progresivamente el problema del diseño, la construcción y la calibración de varios sensores ópticos de pH. A efectos prácticos los cambios de absorción óptica, se traducen en un cambio de color, visualmente perceptible y espectrofotométricamente medible. Los espectros de absorción obtenidos son sensibles en distinto grado, a las variaciones de pH, en este caso en medios líquidos, pudiéndose emplear como parámetro para determinar el pH.
- Como consecuencia de cambios químicos asociados con cambios de concentración en las especies absorbentes al reaccionar con el disolvente, se originan productos con características absorbentes distintas de las del analito. Es lo que ocurre al introducir la variación en el pH, originando una alteración del equilibrio químico. La elevada sensibilidad de los marcadores permite emplear concentraciones muy bajas de fluoróforo. Aún así, la medida de la absorción y de la emisión de fluorescencia exige alcanzar un intervalo de concentraciones óptimo para poder registrar los respectivos espectros de manera adecuada para ambas magnitudes.
- Los cambios fotofísicos de un sensor fluorescente sensible al pH serán detectables en alguno o en todos sus espectros característicos. Hay sensores cuya emisión es sensible al pH, mientras que sus espectros de absorción sufren una variación poco significativa. Otros sensores, experimentan cambios tanto en sus espectros de absorción como en sus espectros de emisión, etc.
- El empleo de una sola técnica espectroscópica no da la información suficiente para poder calificar a un colorante como buen o mal sensor de pH.
- Se obtuvo la curva de calibrado mediante la ley de Lambert-Beer para los tres colorantes, donde se aprecia que le ocurre a la absorbancia mientras la concentración incrementa. Además, se puede determinar fácilmente el valor de una concentración problema gracias a la construcción particular de dicha curva de calibrado.
- El Hoechst 33258 es muy poco sensible al pH. Hoechst no es un buen indicador biológico de pH, pero sí químico. Es mal indicador de posición pero bueno de intensidad, tanto en emisión, como en excitación y absorbancia. Sin embargo, es útil para poder marcar a una determinada  $\lambda_{\text{máx}}$  la intensidad de dicho máximo.
- Para el naranja de acridina se realizó una recta de calibrado para comprobar a qué concentraciones se podía trabajar y se comprobó que a concentraciones superiores a

50  $\mu\text{g/mL}$  no era lineal el comportamiento. Se verifica, en absorción, que no es un buen sensor óptico de pH, sobre todo para la posición. Sin embargo, es más sensible para la intensidad de absorción. No resulta ser un sistema muy interesante desde el punto de vista biológico, aunque si pueda ser buen indicador químico.

- En lo que atañe al naranja de metilo, los primeros intentos de aplicar la espectrofotometría UV-Visible y la fluorescencia al estudio del sistema, indicaron que eran las técnicas adecuadas por los valores de absorbancia e intensidad obtenidos y su variación. En este caso no se utiliza el desplazamiento de la banda fluorescente con el medio, sino el estudio de la intensidad. Se verifica su validez como sensor de pH fluorescente y reversible, al corroborar que tanto la intensidad de fluorescencia como el tiempo de vida de fluorescencia, son sensibles al valor de pH de la disolución. Se trata además, de un aceptable sensor óptico en absorbancia dentro del rango de pH entre 2 y 6, siendo más sensible para los ácidos que para las bases.

## Referencias

- Gras, L.; Maestre, S.E.; Mora, J.; Todolí, J.L. (2005). Introducción a la experimentación en Química Analítica. Ed: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Alicante, ISBN: 84-7908-837-0
- Artur Dybko (2006, junio 20). "Fiber optic chemical sensors" [On line]. Disponible en: <http://csrg.ch.pw.edu.pl/tutorials/fiber>
- Peter Atkins & Julio de Paula (8ª edición, ed. Médica Panamericana): "Atkins Química Física", Oxford University, Lewis and Clark College.
- Nakano M, Arai Y, Kotera I, Okabe K, Kamei Y, Nagai T (2017) Genetically encoded ratiometric fluorescent thermometer with wide range and rapid response; PLoS ONE 12(2): e0172344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172344>
- Gianni Fochi, revista Investigación y Ciencia de septiembre de 2001, páginas 26 y 27.
- Geoffrey M. Cooper & Robert E. Hausman (4ª edición, ed. Marbán): "La Célula", Boston University.
- Lehninger. Principios de Bioquímica de Albert I. Lehninger, 4º ed. 2006.
- Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. Voet D. 2º ed. 2007, ed. Panamericana.
- Bioquímica (1990) Stryer, L. 3ª edición. Ed. Reverté.
- Fundamentos de Bioquímica estructural. Teijon J. 1º ed. 2006, editorial Tebar.
- Principios de Bioquímica. Horton H. 4º ed. 2008, Pearson Educación, México.
- Harper. Bioquímica Ilustrada. Murray R. 17º ed. 2007, México, ed. Manual Moderno.
- Alexeyev, V. Quantitative Analysis. MIR publisher, Moscow. 1986, p. 234-243.
- Gustavo Gómez Sosa (2010): "Indicadores de pH" Química Analítica I, Facultad de Química UNAM.
- Latt, S.A., and Stetten, G., Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. J. Histochem. and Cytochem., 24, 24-33 (1976).
- CRC Handbook of Chemistry & Physics, 74th ed., Lide, D. R., ed., CRC Press (Boca Raton, FL: 1993), pp. 8-19.
- Xie Y. Chen F, He J, Zhao J, Wang H. J Photochem Photobiol A: Chem 136 (2000) 235-40.
- Traganos, F., et al., Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system. J. Histochem. Cytochem., 25(1), 46-56 (1977).
- Geng, Y. J., et al., Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 16(1), 19-27 (1996).
- Miñones, J., "Manual de técnicas instrumentales", Círculo editor Universo. 1978.
- Pedro Villanueva Delgado "Caracterización del NaYF4 impurificado con Yb3+ y Tm3+ y sus potenciales aplicaciones en biomedicina". Máster en nuevos materiales, Universidad de Cantabria, España, 2011 - 2012.



- Lakowicz, J. R. "Principles of Fluorescence Spectroscopy" Springer, 1999, 3-5.
- F. Rodríguez, "Espectroscopia óptica", J. M. Menéndez, F. Aguado, R. Valiente, J.M. Recio Coordinadores, Materia a alta presión, fundamentos y aplicaciones, Servicio de publicaciones Universidad de Oviedo & Universidad de Cantabria 183, 214 (2011).
- L. E. Bausá et al., "An Introduction to the Optical Spectroscopy of Inorganic Solids" Wiley, Madrid, 2005.
- Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition, Baltimore, 2006, pag. 929.
- Applied Sensor Group of the Institute of Analytical Chemistry at the Graz University of Technology in Austria, 2012. Database of Fluorescent Dyes and Applications, <http://www.fluorophores.tugraz.at/>, accedido el 18/09/2019.
- Żurek-Biesiada D., Waligórski P., Dobrucki JW. UV-induced Spectral Shift and Protonation of DNA Fluorescent Dye Hoechst 33258, 2014, Journal of Fluorescence – Article.
- Hussein Hadi & Hilal S. Wahab: "Visible light photocatalytic decolourization of methyl orange using N- doped TiO<sub>2</sub> nanoparticles", Septiembre 2015.
- Sha, Y. et al. Rapid degradation of azo dye methyl orange using hollow cobalt nanoparticles. Chemosphere 144, 1530–1535 (2015).
- Sandberg, Richard G.; Henderson, Gary H.; White, Robert D.; Eyring, Edward M. (1972). "Kinetics of acid dissociation-ion recombination of aqueous methyl orange". The Journal of Physical Chemistry 76 (26): 4023–4025.
- Ronchera-Oms, C.L. (2011): "Técnicas Instrumentales" FarmaFIR, pags: 109, 113, 116, 117, 135.
- Sinfield J. V., Colic O., Fagerman D., y Monwuba C., A Low Cost Time-Resolved Raman Spectroscopy Sensing System Enabling Fluorescence Rejection, Applied Spectroscopy, Volume 64, Number 2, 2010.
- López Arbeloa, F.; Bañuelos, J.; Martínez, V.; Arbeloa, T.; López Arbeloa, I. Structural, photophysical and lasing properties of pyrromethene dyes. 2005.